

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### RECHERCHES SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE DE *RAMIBACTERIUM PLEURITICUM*

par A.-R. PRÉVOT, F. MAGNIN, J. LEVREL, D. DUBY  
et F. de CADORE (\*).

(*Institut Pasteur, Service des Anaérobies  
et Service de Chirurgie thoracique du Sanatorium de la Seine  
à Hauteville*)

#### INTRODUCTION.

Quand Veillon et Zuber, en 1898, décrivirent *B. ramosus* dans les suppurations à anaérobies (espèce caractérisée avant tout par ses pseudoramifications), ils ouvrirent un chapitre nouveau de bactériologie dont l'étude n'a jamais cessé depuis cette date historique. En 1900, Veillon et Morax isolaient d'un cas de péricystite gangréneuse une espèce très voisine, bientôt retrouvée par Runeberg dans les péritonites post-appendiculaires et que cet auteur décrivit, en 1908, sous le nom de *B. ramosoides*, lui aussi pseudoramifié. Ce dernier fut retrouvé par Heyde, en 1911, dans l'appendicite et par Veillon et Repaci, en 1912, dans les cavernes tuberculeuses infectées secondairement par les anaérobies. Cette

(\*) Manuscrit reçu le 16 mai 1958.

même année, Distaso décrivait une autre espèce très voisine isolée de l'intestin humain et l'appelait *B. pseudoramosus*.

En 1922, dans ses études bactériologiques sur l'appendicite aiguë, A.-R. Prévot retrouva des anaérobies ressemblant à ces trois espèces, mais dont il ne put pas faire une détermination exacte. C'est alors qu'il obtint de Veillon une souche typique de l'espèce *ramosus* dont il étudia tous les caractères culturels, ce qui servit de point de départ à la clef de détermination des anaérobies de ce groupe. En 1938, il avait pu étudier ainsi 18 souches de l'espèce *ramosus*, 6 de l'espèce *pseudoramosus*, 1 de l'espèce *ramosoides*, ce qui lui avait confirmé qu'il s'agissait bien de trois espèces différentes, nettement individualisées par une mosaïque enzymatique spécifique. Comme ces trois espèces n'étaient certainement pas des *Bacillus* puisque non sporulées, il en fixa la position systématique parmi les *Bacteriaceae*, dans le nouveau genre *Ramibacterium* [4] caractérisé par ses pseudoramifications.

En 1942, A.-R. Prévot et J. Taffanel [2] décrivent une quatrième espèce du genre *Ramibacterium*, isolée dans les cellulites jugales, retrouvée plus tard dans les pleurésies purulentes, les abcès du cerveau, les suppurations d'origine bucco-dentaire. Cette nouvelle espèce, *R. alactolyticum*, différait essentiellement des autres par l'absence de fermentation du lactose et l'absence de coagulation du lait.

En 1946, Prévot, Raynaud et Digeon [3] isolent dans le pus de pleurésies purulentes une cinquième espèce : *R. pleuriticum*, différente des premières par son type fermentaire (acéto-valériannique-lactique), l'absence de production d'indole et d'acétoïne.

Enfin, Vinzent et Reynes, en 1947, décrivent une sixième espèce : *R. dentium* [4], isolée du tartre dentaire, retrouvée ensuite dans des infections bucco-dentaires et des pleurésies purulentes.

Depuis la description initiale de *R. pleuriticum*, qui ne permettait pas de prévoir l'importance de cette espèce, Beerens en retrouva 25 souches [5] et A.-R. Prévot et ses collaborateurs (P. Tardieux, N. Aladame, F. de Cadore, H. Thouvenot) en totalisèrent 19 souches. Il se trouve donc que *R. pleuriticum* est actuellement l'espèce de beaucoup la plus fréquente du genre *Ramibacterium*, puisque pendant le même temps nous n'isolions que 5 souches de *R. ramosus*, 2 de *R. ramosoides*, 2 de *R. pseudoramosus*, 1 de *R. alactolyticum* et 3 de *R. dentium*. On peut même dire qu'à elle seule elle est plus fréquente que toutes les autres espèces réunies du même genre. Une étude d'ensemble de son pouvoir pathogène pour l'homme était donc devenue statistiquement possible et elle fut doublée par l'étude de son pouvoir pathogène expérimental pour le cobaye.

Ce sont ces recherches qui vont être exposées.



ORIGINE DE NOS SOUCHES  
ET RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS CORRESPONDANTES.

Nous recevons, en général, très peu de renseignements sur l'infection dont on nous demande un diagnostic bactériologique et un antibiogramme. C'est pourquoi les observations 1472 et 1853 prennent une grande valeur dans cette étude.

1° *Souche 262 A* : isolée du pus prélevé par seringue stérile d'un cas de pleurésie purulente (Gor..., août 1946) envoyé par le D<sup>r</sup> Cordier (hôpital de Saint-Denis). Ce pus était monomicrobien. La culture de cette souche était complètement inhibée par 1 unité de pénicilline. L'injection de 1 cm<sup>3</sup>, de 2 cm<sup>3</sup> au cobaye par voie intramusculaire reste sans effet. L'injection intraveineuse ou intrapleuropulmonaire des mêmes doses reste sans effet sur le lapin.

2° *Souche 264 A* : isolée du pus prélevé par seringue stérile d'un cas de pleurésie purulente (Mal..., septembre 1946) envoyé par le D<sup>r</sup> Jacob (hôpital Saint-Antoine). Ce pus était monomicrobien. La culture de cette souche était complètement inhibée par 2 unités de pénicilline. L'injection de 2 cm<sup>3</sup> de culture au cobaye reste sans effet.

3° *Souche 339 C* : isolée d'une escarre prélevée à l'ouverture chirurgicale d'un abcès du poumon (Mart..., 26 mars 1948) envoyée par le D<sup>r</sup> Jacob (hôpital Saint-Antoine). Ce prélèvement était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Eubacterium disciformans*. La souche était sensible à la pénicilline. L'injection de culture au cobaye reste sans effet.

4° *Souche 364 A* : isolée d'un pus gangréneux retiré directement par ponction transpariétale d'un abcès du poumon sous repérage radioscopique (X..., 15 septembre 1948) envoyé par le D<sup>r</sup> Jacob (hôpital Saint-Antoine). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Eubacterium disciformans* et *Micrococcus prevoti*. La souche était sensible à la pénicilline. Injectée au cobaye, elle n'a provoqué aucune lésion.

5° *Souche 463 A* : isolée d'un mucus purulent de rectocolite hémorragique (Y..., 30 août 1948) envoyé par le D<sup>r</sup> Piéchaud (Institut Pasteur). Ce matériel était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Catenabacterium contortum* et à *Neisseria* sp, morte avant détermination. La culture de cette souche n'était pas pathogène pour le cobaye, mais 0,5 cm<sup>3</sup> de filtrat de culture de 24 heures tuait la souris par voie intraveineuse en vingt minutes. La souche était sensible à la pénicilline.



6° *Souche 862* : isolée du pus de pleurésie purulente (Thu..., 12 février 1953) envoyé par le D<sup>r</sup> Vinzent (hospices du Havre). Ce pus était monomicrobien. La souche était sensible à la pénicilline. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

7° *Souche 949* : isolée du pus d'une pleurésie purulente enkystée (Bie..., 25 août 1953) envoyé par le D<sup>r</sup> Trenszt (de Strasbourg). Ce pus était monomicrobien. La souche était sensible à la pénicilline. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

8° *Souche 953 B* : isolée d'une pleurésie purulente (Z..., 7 août 1953), envoyée par le D<sup>r</sup> Mignot (hôpital Saint-Joseph). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Catenabacterium cateniforme*. La souche était très sensible à la pénicilline et à la chloromycétine, sensible à l'auréomycine et à la terramycine. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

9° *Souche 1026 B* : isolée du pus d'un phlegmon gangréneux de la fosse ischio-rectale (X..., 17 février 1954) envoyé par le D<sup>r</sup> Lutz (de Strasbourg). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé avec *Spherophorus gulosus* et un streptocoque facultatif. La souche était sensible à la pénicilline. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

10° *Souche 1063 A* : isolée d'une pleurésie purulente (Dan..., 25 avril 1954), envoyée par le D<sup>r</sup> Sirjean (de Boulogne-sur-Seine). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Streptococcus anaerobius*. La souche était très sensible à pénicilline, chloromycétine, auréomycine, érythromycine, spiramycine, carbomycine ; sensible à terramycine, tétracycline, bacitracine ; insensible à framycétine, streptomycine, néomycine. Elle était pathogène pour le cobaye. Un premier cobaye injecté avec 0,75 cm<sup>3</sup> est mort au dix-huitième jour sans lésion apparente. Un deuxième cobaye injecté avec 1,5 cm<sup>3</sup> est mort au treizième jour avec une péritonite sérofibrineuse et une congestion pulmonaire.

11° *Souche 1218* : isolée d'un prélèvement fait par bronchoscopie d'un abcès du poumon (Y..., 11 février 1955) envoyé par le D<sup>r</sup> Galland (hôpital Boucicault). Ce pus était monomicrobien. La souche était sensible à la pénicilline ; elle n'était pas pathogène pour les animaux.

12° *Souche 1356 A* : isolée du pus d'une pleurésie purulente (Deu..., 13 octobre 1955) envoyé par le D<sup>r</sup> Greib (de Sarre-

bourg). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Eubacterium ventriosum*. La souche était sensible à la pénicilline. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

13° *Souche 1472 B* : isolée du pus d'une adénopathie purulente de la région sous-claviculaire pré-sternale (Gie..., 29 février 1956) envoyé par le Dr Schuch (de Strasbourg). A l'incision, 0,5 l de pus fétide, contenant de rares grains blancs, s'écoule. Une fistule s'établit, qui livre quelques centimètres cubes de pus par jour. Ce pus est polymicrobien ; *R. pleuriticum* y est associé avec *Catenabacterium cateniforme*. La souche est sensible uniquement à la pénicilline sur les 10 antibiotiques éprouvés. La souche n'est pas pathogène pour le cobaye. Le malade traité par la pénicilline est guéri.

14° *Souche 1598 D* : isolée du pus d'une pleurésie purulente (Gir..., 17 octobre 1956) envoyé par le Dr Houradou (de Rochefort-sur-Mer). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Streptococcus putridus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Catenabacterium cateniforme*. La microflore totale était très sensible à pénicilline, chloromycétine, auréomycine, terramycine, tétracycline, érythromycine et bacitracine. Elle était insensible aux autres antibiotiques. Elle n'était pathogène ni pour le cobaye, ni pour la souris.

15° *Souche 1611 A* : isolée du pus fétide d'un abcès du Douglas après appendicite gangréneuse (Sau..., 7 novembre 1956) envoyé par le Médecin Lieutenant-Colonel Thiry (de Metz). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* était associé à *Fusocillus girans*. Cette souche était très sensible à auréomycine, terramycine, tétracycline, bacitracine, chloromycétine et érythromycine. Elle était insensible aux autres antibiotiques, en particulier à la pénicilline. Elle n'était pas pathogène pour les animaux.

16° *Souche 1715 A* : isolée du pus d'un ostéophlegmon du maxillaire (Ans..., 27 avril 1957) envoyé par le Dr Courtieu (Institut Pasteur de Lyon). Ce pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à un staphylocoque blanc et à *W. perfringens*. La souche était sensible à la pénicilline et n'était pas pathogène pour les animaux.

17° *Souche 1753* : isolée du pus d'une pleurésie purulente (Len..., 6 juillet 1957) envoyé par le Dr Robin (du Centre hospitalier de Rouen). Ce pus était monomicrobien. La souche était sensible à la pénicilline, non pathogène pour les animaux.

18° *Souche 1826* : isolée du pus d'une pseudoactinomycose (Rob..., 17 décembre) envoyé par le Dr Terrial (de Paris). Ce

pus était polymicrobien ; *R. pleuriticum* y était associé à *Fusiformis fusiformis*. La souche était très sensible à chloromycétine, sensible à auréomycine, terramycine et tétracycline, insensible aux autres antibiotiques, en particulier à la pénicilline. Elle n'était pas pathogène pour les animaux.

19° Souche 1853 : isolée du pus d'une gangrène pulmonaire d'évolution clinique très particulière (Mou..., 3 février 1958) envoyé par le Dr Magnin (d'Hauteville). Ce pus était probablement polymicrobien, mais seul *R. pleuriticum* y fut isolé. Cette souche n'était pas pathogène pour les animaux. Elle était sensible à pénicilline, auréomycine, tétracycline, bacitracine, érythromycine, carbomycine.

L'observation de ce cas et son évolution ayant pu être recueillies par les soins de F. Magnin et des médecins du sanatorium Belligneux, d'Hauteville, nous les publions intégralement ci-dessous :

M..., 34 ans, éboueur. Début brusque le 3 juillet 1957 par un point de côté droit accompagné d'une température à 39°, sans toux, ni expectoration. Traitement par la pénicilline. Puis la radiographie ayant montré une opacité de la partie moyenne du poumon droit, ce malade est considéré comme tuberculeux et, à partir du 17 juillet 1957, il est traité par la streptomycine et l'INH. Les examens bactériologiques ont été négatifs.

Il est envoyé au sanatorium le 27 septembre 1957.

A l'entrée, c'est un sujet d'apparence fragile (59 kg pour 1,63 m) aux faciès vultueux (éthylique et gros fumeur) ; il est apyrétique et ne présente aucun signe fonctionnel respiratoire (toux ou expectoration). A noter dans les antécédents une dysenterie amibienne pendant le service militaire, ayant laissé quelques séquelles intestinales périodiques. Les seuls signes sont radiologiques : il s'agit d'une image grossièrement arrondie siégeant à la partie moyenne du poumon droit, elle est de la taille d'une petite mandarine, très homogène, sauf à sa partie supérieure où il semble que l'on distingue une petite perte de substance.

La cuti-réaction est faiblement positive. Des examens de crachats par tubages après homogénéisation et cultures ne révèlent pas la présence de B. K. ; le malade est mis en observation en continuant le traitement qui a été institué avant son arrivée.

Au cours des deux mois qui vont suivre, aucune modification clinique ou radiologique ne survient. Les examens concernant la tuberculose restent négatifs, et l'on songe à réviser le diagnostic d'entrée, d'autant plus qu'au mois de novembre l'opacité radiologique, tout en restant homogène et à contours nets, augmente d'étendue. Etant donné l'absence de tout signe d'infection et de toute expectoration, on s'oriente à ce moment vers le diagnostic de néoplasme bronchiolaire.

Une bronchoscopie et un bronchogramme lipiodolé sont pratiqués, qui n'apportent aucun éclaircissement. L'examen des sécrétions bronchiques ne montre pas de cellule néoplasique, et ne montre pas non



plus de germe pathogène ; l'expectoration est, d'ailleurs, toujours nulle. Un bronchogramme du 13 décembre 1957 montre l'amputation des bronches périphériques postérieures, aussi bien des segments postérieurs du lobe supérieur que du sommet de Fowler du lobe inférieur.

Au mois de décembre et toujours sans aucun signe clinique, l'aspect radiologique change. La masse parenchymateuse augmente encore de volume et un niveau liquidien important y apparaît. On pense à une liquéfaction du néoplasme, on redoute une irruption dans la cavité pleurale et une inondation bronchique. On décide l'intervention.

Celle-ci est pratiquée le 3 janvier 1958. L'examen du poumon après thoracotomie montre d'abord une surface pulmonaire sphacelée, jaunâtre, en voie de fissuration. La palpation montre que les lésions sont très indurées et qu'elles sont à cheval sur les trois lobes. On conclut encore à un cancer en voie de sphacèle et on décide une pneumonectomie totale. Cette pneumonectomie est difficile, des ganglions et des lames fibreuses soudant, en effet, les lames périculaires au péricarde et à la veine cave. Comme l'on pense à un cancer, on enlève aussi les ganglions sous-bronchiques qui s'enfoncent loin dans le médiastin.

À la coupe de la pièce on trouve une cavité de la taille d'un pamplemousse faite de tissus sphacelés d'odeur putride. Cette cavité aux bords anfractueux occupe la totalité du sommet de Fowler, traverse la scissure et entame le lobe supérieur et le lobe moyen, intéressant le poumon dans presque toute son épaisseur. Le parenchyme avoisinant est oedémateux et laisse couler une sérosité blanche. La cavité est occupée par un pus verdâtre, foncé, fétide, de consistance assez fluide et d'un volume de 200 cm<sup>3</sup> environ. L'examen bronchique ne montre aucun bourgeon dans leur lumière, mais simplement une oblitération de toutes les bronches au contact de cette masse. Différents éléments sont envoyés au professeur Feroldi.

EXAMEN N° 10488. — 1° *Paroi de diverticule de cavité contenant du poumon sphacélé.* — Cette paroi est constituée par une membrane pyogène se raccordant à un parenchyme où s'observent des lésions pneumoniques avec exsudats fibrino-leucocytaires dans les alvéoles.

2° *Bronche au contact de cette masse.* — La paroi bronchique est bordée par un épithélium normal, ou enflammé, reposant sur un chorion infecté, mais sans caractère spécifique. Cette infection se retrouve au niveau des glandes bronchiques, les cartilages sont partiellement ossifiés ; les vaisseaux de la péribronche sont normaux. A distance, le parenchyme est tantôt emphysémateux, de petites zones sont le siège d'alvéolite fibrino-histiocytaire banale.

3° *Ganglion médiastinal.* — Adénite subaiguë avec anthracose. Nulle part, il n'a été vu de lésions tuberculeuses.

Les suites de l'intervention ont été dramatiques. Le malade est ramené dans son lit en bon état, mais, dans l'heure qui suit, un encombrement pulmonaire du côté opposé devient rapidement asphyxiant. On met en place une canule de trachéotomie par laquelle, pendant plus d'une heure, on aspire un oedème sanglant qui traduit

une défaillance myocardique aiguë. Décès dans le milieu de l'après-midi.

Cette observation mérite les remarques suivantes :

1° L'évolution clinique absolument muette de ce foyer de gangrène pulmonaire qui n'a déterminé ni expectoration, ni toux, ni dyspnée, ni fétidité de l'haleine, ni signe infectieux et généraux, et cela pendant plus de quatre mois, est à souligner.

2° L'évolution absolument fermée de cette lésion qui avait réalisé l'oblitération de tout le système bronchique contigu est singulière.

3° La mort post-opératoire que n'explique pas l'intervention elle-même, qui ne s'était pas accompagnée de traumatisme anatomique important, ni de perte sanguine irrémédiable (environ 700 cm<sup>3</sup> compensés par la réanimation). Il y a eu, chez ce sujet, surtout un facteur toxicardiaque inhabituel, car l'inondation pulmonaire n'est pas venue du poumon malade, mais est d'origine cardio-vasculaire.

#### DISCUSSION.

L'étude de ces 19 cas d'infection due à *R. pleuriticum* mérite une analyse minutieuse. Tout d'abord la topographie de l'infection est frappante : 13 cas à topographie pleuro-pulmonaire contre 6 cas à topographie autre. Sur les 13 cas de la première catégorie, 9 étaient des pleurésies purulentes et 4 des abcès du poumon (ou leur équivalent). Le germe mérite donc bien son nom spécifique *pleuriticum*, donné après l'étude des deux souches princeps 262 A et 264 A, isolées dans des pleurésies purulentes. Sur les 6 cas à topographie non pleuro-pulmonaire, nous relevons 3 infections d'origine intestinale : 463 A, rectocolite hémorragique ; 1026 B, phlegmon gangréneux ischio-rectal ; 1611 A, abcès du Douglas post-appendiculaire ; et 3 infections d'origine bucco-dentaire probable : 1472 B, adénite purulente fétide sous-claviculaire ; 1715 A, ostéophlegmon du maxillaire ; 1826 B, pseudoactinomycose cervico-faciale.

Cette topographie confirme partiellement les résultats exposés par Beerens [5], bien que les données statistiques de cet auteur soient inverses des nôtres : 18 cas à topographie bucco-intestinale contre 7 cas à topographie pleuro-pulmonaire.

Une deuxième constatation d'une grande importance pour la compréhension du pouvoir pathogène de cette espèce est le fait que, si elle a bien été rencontrée 13 fois en association avec d'autres germes (surtout anaérobies), elle fut rencontrée 6 fois à l'état pur. Dans ces derniers cas, *R. pleuriticum* étant le seul germe en cause, on peut affirmer qu'il est pathogène pour l'homme. Ces 6 cas comprennent 5 pleurésies purulentes et 1 abcès du poumon, ce qui permet de dire qu'en culture pure ce germe a une affinité toute particulière pour l'appareil respi-



ratoire. Dans les cas où nous l'avons trouvé associé, voici la fréquence des espèces rencontrées :

Anaérobies stricts ...	{	<i>Catenabacterium catena-</i> <i>forme</i> .....	3 fois
		<i>Catenabacterium contortum</i>	1 fois
		<i>Eubacterium disciformans</i> .	2 fois
		<i>Eubacterium ventriosum</i> ..	1 fois
		<i>Fusiformis fusiformis</i> ....	1 fois
		<i>Fusocillus girans</i> .....	1 fois
		<i>Streptococcus putridus</i> ...	1 fois
		<i>Streptococcus anaerobius</i> ..	1 fois
		<i>Micrococcus prevoti</i> .....	1 fois
		<i>Welchia perfringens</i> .....	1 fois
Anaérobies facultatifs	{	<i>Spherophorus gulosus</i> ....	1 fois
		Streptocoque pyogène ....	1 fois
		Staphylocoque blanc .....	1 fois
		<i>Neisseria</i> sp .....	1 fois
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ...	1 fois

A part le cas 1715 où l'un des germes associés était *W. perfringens*, ce sont les germes habituels de la microflore endogène asporulée qu'on trouve associés à *R. pleuriticum*.

*Pouvoir pathogène expérimental* : Sur les 19 souches étudiées, une seule, la 1063 A, s'est montrée pathogène pour le cobaye, qu'elle tue avec les lésions classiques des souches exceptionnellement pathogènes pour les animaux appartenant au genre *Ramibacterium*, soit péritonite sérofibrineuse et congestion pulmonaire, lésions où l'on retrouve l'affinité bien connue de ce genre pour les muqueuses et l'appareil respiratoire. L'extrême rareté des souches pathogènes de la microflore endogène pour les animaux de laboratoire a été étudiée ailleurs [6, 7], de même que le substratum de leur pouvoir pathogène pour l'homme ; nous n'y reviendrons pas et nous nous contenterons de résumer les quelques faits bien établis et les hypothèses de travail émises pour tenter d'élucider les inconnues du problème :

1° Beaucoup d'anaérobies asporulés ne sont pathogènes qu'en association (Veillon et son école ; Weinberg et Prévot).

2° Ceux qui sont pathogènes en culture pure pour l'homme sont rarement pathogènes pour l'animal, soit qu'on ne connaisse pas l'animal réceptif (Boë ; Prévot), soit que le germe perde en culture le ou les enzymes qui lui permettent de synthétiser ses facteurs de virulence.

3° Les antigènes létaux sont exceptionnels chez eux : l'antigène de Schwartzman de *Ristella melaninogenica* (Cohen) ; l'antigène protéo-lipido-glucidique des *Spherophorus*, nécrosant, provoquant les lésions nécrotiques des sphérophoroses (Prévot et Kirchheiner).

Beerens a cru pouvoir établir une relation de cause à effet entre l'existence de *R. pleuriticum* dans des syndromes d'allure actinomycosique où il l'a retrouvé 11 fois, et l'allure actinomycosique elle-même de ces syndromes. Il a essayé de reproduire le pus à grains jaunes chez l'animal après préparation du terrain suivant la méthode de Meyer et Verges [8], ou celle de Mazurek, Tardieux et Prévot [9], et a échoué. Ceci va à l'encontre de l'opinion qu'il émet sur la position systématique de l'espèce *pleuriticum*, qui, d'après lui, serait une actinomycétale du genre *Corynebacterium*; car avec les actinomycétales anaérobies isolées d'actinomycose, on reproduit facilement chez l'animal préparé le syndrome actinomycosique. D'autre part, la morphologie et les caractères culturels de *R. pleuriticum* sont opposés à ceux des *Corynebacterium* anaérobies.

On peut résumer ces oppositions dans le tableau ci-joint.

	<u>Musques</u>	<u>Catalase</u>	<u>Type fermentaire</u>	<u>Maladie expérimentale</u>
<u>Ranibacterium</u> <u>pleuriticum.</u>	rare ; n'apparaissant qu'après souf- france en mi- lieu cystéiné type Rosenow	0	acide valériani- que constant et dominant	péritonite sérofibrineuse. Congestion pulmonaire.
<u>Corynebacterium</u> <u>anaérobies.</u>	précoces, fréquentes constantes et spontanées	+ spontanée ou de mutation.	Acide propioni- que constant et dominant.	Réticulose plasmodiale et endocardite verruqueuse.

Le fait que dans certains syndromes d'allure actinomycosique on ne trouve pas d'*Actinobacterium* est bien connu. Prévot, Beal et Tardieux [40] les ont bien décrits en 1950 et ont proposé de les appeler pseudoactinomycoses; on y rencontre surtout des anaérobies appartenant aux genres *Ranibacterium*, *Corynebacterium*, *Fusiformis* et *Fusocillus*, plus rarement *Spherophorus*, et nous pensons que les 11 cas où il a rencontré *R. pleuriticum* à l'exclusion des *Actinobacterium* étaient des pseudoactinomycoses. Un dernier argument contre la thèse de Beerens est la sensibilité aux antibiotiques de *R. pleuriticum*.

**Antibiogramme :** Les 25 souches de Beerens étaient sensibles à la pénicilline, à l'auromycine, à la terramycine et à la chloromycétine. Toutes les nôtres, sauf 2, étaient sensibles à la pénicilline et à la plupart des antibiotiques classiques. Or les *Actinobacterium* sont presque toujours insensibles à la famille de la pénicilline et aux antibiotiques classiques. Les deux souches résistantes à la pénicilline étaient très sensibles aux antibiotiques

classiques. Ceci est à nos yeux l'argument le plus important pour laisser l'espèce *pleuriticum* rattachée au genre *Ramibacterium* puisqu'elle en a la morphologie, la physiologie, les propriétés biochimiques, le pouvoir pathogène et les réactions aux antibiotiques.

#### CONCLUSIONS.

1° *R. pleuriticum* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée du genre *Ramibacterium*.

2° Elle est pathogène pour l'homme chez lequel elle présente une affinité particulière pour l'appareil respiratoire et le tube digestif. L'infection où on la rencontre le plus souvent est la pleurésie purulente. Toutes les infections où on l'isole ont la même allure que les autres ramibactérioses (à *R. ramosum*, *R. alactolyticum*, *R. ramosoides*, *R. pseudoramosum* et *R. dentium*) et ne ressemblent pas aux corynebactérioses naturelles et expérimentales [41].

3° Elle peut être pathogène en culture pure (souvent chez l'homme, rarement chez l'animal d'expérience), mais c'est surtout en association qu'elle est pathogène pour l'homme.

C'est avant tout un pyogène ; elle peut, en association, provoquer des syndromes pseudoactinomycosiques.

4° Elle est très sensible (sauf exception) à la pénicilline et aux antibiotiques classiques.

5° Sa morphologie, ses propriétés biochimiques, son pouvoir pathogène et ses réactions aux antibiotiques confirment qu'elle appartient bien au genre *Ramibacterium* et non au genre *Corynebacterium*.

#### SUMMARY

##### STUDIES ON THE PATHOGENICITY OF *Ramibacterium pleuriticum*.

1. *Ramibacterium pleuriticum* is the most frequently encountered species of the genus *Ramibacterium*.

2. It is pathogenic for human beings ; it possesses a peculiar affinity towards the respiratory and digestive tracts, and may be isolated principally from purulent pleurisy. All infections from which *R. pleuriticum* is isolated are comparable to ramibacteriosis (induced by *R. ramosum*, *R. alactolyticum*, *R. ramosoides*, *R. pseudoramosum* and *R. dentium*) and are quite different from natural or experimental corynebacteriosis.

3. *R. pleuriticum* may be pathogenic when in pure culture (often for man, rarely for experimental animals). But it is particularly pathogenic for man when associated with other germs. It is above all a pyogenic bacterium ; when associated with other germ, it may induce a pseudo-actinomycosis syndrom.



4. But for a few exceptions, it is very sensitive to penicillin and to other classical antibiotics.

5. Its morphology, biochemical properties, pathogenicity and response to antibiotics prove that it belongs to the genus *Ramibacterium* and not to the genus *Corynebacterium*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **60**, 285
  - [2] PRÉVOT (A.-R.) et TAFFANEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 259.
  - [3] PRÉVOT (A.-R.), M. RAYNAUD et M. DIGEON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 481.
  - [4] VINZENT (R.) et REYNES (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 594.
  - [5] BEERENS (H.). *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 1953-1954, **6**, 116.
  - [6] PRÉVOT (A.-R.). *Rev. Belge Path. Méd. exp.*, 1951, **21**, 67.
  - [7] PRÉVOT (A.-R.). *Actes du Congrès de Caen*, 1955, p. 467.
  - [8] MEYER (E.) et VERGES. *J. Lab. clin. Méd.*, 1950, **36**, 667.
  - [9] MAZUREK (C.), TARDIEUX (P.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 186.
  - [10] PRÉVOT (A.-R.), BEAL (J.) et TARDIEUX (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 763.
  - [11] PRÉVOT (A.-R.) et TARDIEUX (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 879.
-

**INFRA-ALLERGIE DÉCELÉE**  
**PAR LES CORPS BACILLAIRES COMPLETS**  
**ET RÉSISTANCE ANTITUBERCULEUSE**  
**CONFÉRÉE PAR LE BCG**

par L. NÈGRE, J. BRETEY et M<sup>me</sup> D. ROY (\*).

*(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose)*

Nous nous sommes proposé de rechercher chez des animaux vaccinés par le BCG si l'infra-allergie décelée par les corps bacillaires a la même valeur que l'allergie révélée par la tuberculine comme signe de la résistance antituberculeuse.

Dès 1927, A. Boquet et L. Nègre ont montré que, dans la tuberculose, l'allergie et l'immunité sont deux phénomènes distincts. Ils en ont donné une preuve formelle en prouvant que des cobayes ou des lapins préparés par des injections sous-cutanées répétées de la solution mère d'antigène méthylique, qui ne leur confèrent aucune allergie, acquièrent une résistance marquée à une infection tuberculeuse d'épreuve.

Mais si ces deux propriétés nouvelles des sujets vaccinés sont indépendantes l'une et l'autre, il n'en demeure pas moins que, provoquées par la même cause, elles évoluent parallèlement. Aussi, à défaut d'un test d'immunité, l'allergie tuberculinique nous donne des renseignements précieux sur l'apparition et la disparition de la résistance provoquée par le BCG.

On a admis jusqu'à présent que, chez les cobayes et les bovidés qui ont été vaccinés par une injection sous-cutanée de BCG, la résistance conférée par ce vaccin disparaît peu après l'extinction de l'allergie tuberculinique vaccinale, dans un délai de six mois environ chez les premiers et d'un an chez les seconds.

En clinique vétérinaire comme en clinique humaine, la disparition de l'allergie vaccinale chez les sujets qui ont été prémunis par le BCG indique le moment où ils doivent être revaccinés. Cette méthode impose des revaccinations fréquentes chaque année chez les bovidés et à des intervalles plus ou moins prolongés chez l'enfant, suivant la voie employée pour l'administration du BCG.

(\*) Manuscrit reçu le 21 avril 1958.

Cependant, d'après les faits mis en évidence par Aronson et Palmer ainsi que par Wallgren et ses collaborateurs, il semble que des enfants, vaccinés une seule fois par la voie intradermique, ont conservé pendant une période beaucoup plus longue une résistance aux contaminations auxquelles ils ont été exposés.

Aussi était-il permis de se demander si une période d'infra-allergie, décelée par les corps bacillaires complets après la perte de l'allergie vaccinale à la tuberculine, ne correspondrait pas à une prolongation de la résistance antituberculeuse conférée par le BCG, et si l'extinction de l'allergie aux corps bacillaires serait le signe de la disparition complète de la résistance antituberculeuse après celle de la sensibilité à la tuberculine.

Nous avons essayé de nous en rendre compte par une série d'expériences faites chez le cobaye vacciné par le BCG par différentes voies.

Les cobayes vaccinés ont été éprouvés par une injection intradermique de 0,1 cm<sup>3</sup> de tuberculine brute diluée au 1/20. Chez ceux qui ne réagissaient plus à cette dose, un BCG-test a été effectué par scarification de la peau au travers d'une goutte de suspension de bacilles BCG tués par la chaleur et dosés à 75 mg de germes par centimètre cube.

Les cobayes vaccinés ont été infectés par des bacilles virulents, soit au moment où ils avaient cessé de réagir à la tuberculine, mais réagissaient encore au BCG-test, soit après l'extinction de ce dernier.

Nous avons sacrifié ces animaux ainsi que les cobayes témoins au moment où ceux-ci commençaient à avoir des lésions importantes sur leurs divers organes, afin de comparer à ce point de vue les vaccinés et les témoins.

Nous n'avons tenu compte que des lésions des organes, celles des ganglions de la porte d'entrée ne fournissant souvent que des renseignements contradictoires.

#### A. — VACCINATION PAR LA VOIE INTRADERMIQUE.

EXP. I. — Cobayes vaccinés par injection intradermique de 0,1 mg de BCG. Un an après, l'I. D. est négative, le BCG-test est positif. Eprouvés, ainsi que deux cobayes neufs témoins, par inoculation sous-cutanée de 0,0001 mg de la souche humaine H37Rv. Sacrifiés deux mois après cette épreuve (tableau I).

Les cobayes vaccinés par injection intradermique de BCG, à I. D. négative, mais à BCG-test positif, ont donc paru conserver une résistance antituberculeuse semblable à celle qu'ils présentent après cette vaccination lorsqu'ils sont encore doués de la sensibilité à la tuberculine.



TABLEAU I.

	<u>Vaccinés</u>				
	ID 1 an après	BCG-test 1 an après	Rate	Foie	Poumons
I	0	+	0	0	0
II	0	+	rare tb.	0	0
	<u>Témoins</u>				
	I		nombreux tb.	nombreux tb.	nombreux tb.
II			id	id	id

## B. — VACCINATION PAR LA VOIE SOUS-CUTANÉE.

Exp. II. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 5 mg de BCG. Sept mois après, I. D. = 0, BCG-test = +. Eprouvés alors ainsi que des cobayes neufs témoins par inoculation sous-cutanée de 0,001 mg de la souche H37Rv. Sacrifiés trois mois et demi après l'épreuve (tableau II).

TABLEAU II.

	<u>Vaccinés</u>				
	ID 7 mois après V	BCG-test 7 mois après V	Rate	Foie	Poumons
I	0	+	0	0	0
II	0	+	0	0	0
III	0	+	0	0	0
IV	0	+	0	0	0
	<u>Témoins</u>				
	I		nombreux tb.	nombreux tb.	nombreux tb.
II			assez nb.tb.	0	assez nb.tb.
III			assez nb.tb.	id	assez nb.tb.
IV			assez nb.tb.	id	assez nb.tb.

Les cobayes vaccinés, bien que ne réagissant plus qu'aux corps bacillaires, n'ont présenté aucune lésion apparente alors que les témoins avaient de nombreux tubercules sur leurs organes.

Exp. III. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Cinq mois plus tard, intradermo-réaction à la tuberculine,

puis BCG-test. Ils sont alors éprouvés ainsi que des cobayes neufs témoins par inoculation sous-cutanée de 1/500 de milligramme de la souche H37Rv. Sacrifiés trois mois après (tableau III).

TABLEAU III.

		<u>Vaccinés</u>					
	ID	: BCG-test	: Rate	: Foie	: Poumons		
	5 mois	:	:	:	:		
	après V	:	:	:	:		
I	+	:	3	0	5		
II	+	:	1	0	1		
III	+	:	1	0	0		
IV	+	:	3	0	10		
V	+	:	7	0	2		
I	0	:	0	0	2		
II	0	:	0	0	0		
III	0	:	0	0	1		
IV	0	:	0	0	0		
		:	<u>Témoins</u>	:	:		
9 cobayes		:	Hyp. très nb.tb.	très nb.tb.	très nb.tb.		

Parmi les cobayes vaccinés, ceux qui n'étaient plus sensibles qu'aux corps bacillaires ont présenté une résistance antituberculeuse comparable à celle des animaux réagissant encore à la tuberculine, peut-être même un peu plus élevée.

Il était donc acquis par ces trois premières expériences que les cobayes vaccinés par le BCG par les voies intradermique ou sous-cutanée qui ont cessé de réagir à la tuberculine conservent leur résistance antituberculeuse lorsqu'ils réagissent encore aux corps bacillaires.

Nous allons voir maintenant comment évolue la résistance antituberculeuse chez les cobayes vaccinés qui ont cessé de réagir non seulement à la tuberculine mais aussi au BCG-test.

Exp. IV. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Treize mois après, l'I. D. à la tuberculine étant négative, les trois survivants sont soumis à un BCG-test, qui est renouvelé

deux mois plus tard. Ils sont alors éprouvés ainsi que des cobayes neufs témoins par inoculation sous-cutanée de 1/200 de milligramme de la souche bovine 1099. Sacrifiés six semaines après leur inoculation (tableau IV).

TABLEAU IV.

Vaccinés					
	1er BCG-test:	2ème BCG-test:	Rate	Foie	Poumons
	13 mois	15 mois			
	après V	après V			
I	++	+	assez nb.tb.	assez nb.tb.	assez nb.tb.
II	0	0	hyp.nb.tb.	nb.tb.	rare tb.
III	++	0	hyp.nb.tb.	0	rare tb.
4 témoins			hyp.tb.conf.	tb.conf.	nb.tb.

conf. = confluent.

Le seul cobaye vacciné qui est resté sensible aux corps bacillaires est celui qui présente le moins de lésions. Les deux cobayes vaccinés qui ne réagissent plus aux corps bacillaires ont presque autant de lésions que les cobayes témoins.

Exp. V. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Treize et seize mois après I. D. et BCG-test suivis d'une épreuve avec quatre cobayes témoins par inoculation sous-cutanée de 1/2 000 de milligramme de la souche bovine 1099. Sacrifiés six semaines après cette épreuve (tableau V).

Il semble que dans cette expérience les cobayes vaccinés qui ne réagissaient plus aux corps bacillaires avaient conservé presque la même résistance antituberculeuse que ceux restés sensibles à la tuberculine.

Exp. VI. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG I. D. faite quatorze mois et dix-neuf mois après leur vaccination. Les cobayes qui ne réagissent plus à la tuberculine reçoivent un BCG-test qui est négatif. Eprouvés vingt mois après leur vaccination par inoculation sous-cutanée de 0,001 mg de la souche bovine 1099. Sacrifiés deux mois après leur infection (tableau VI).

On voit qu'au vingtième mois après leur vaccination les cobayes qui ne réagissaient plus ni à l'I. D. à la tuberculine, ni au BCG-test, n'ont présenté après leur inoculation par des bacilles virulents que quelques rares granulations sur certains de leurs organes, alors que les cobayes témoins étaient très sévèrement infectés.



TABLEAU V.

<u>Vaccinés</u>						
ID		13 mois après BCG-test	:	16 mois après BCG-test	:	Rate
			:		:	Foie
			:		:	Poumons
I	E	0	:	0	:	3 tb.
II	E	0	:	0	:	2 tb.
III	E	0	:	0	:	2 tb.
IV	+		:	+	:	5 tb.
V	+		:	+	:	1 tb.
<u>Témoins</u>						
I			:		:	hyp.nb.tb.
II			:		:	assez nb.tb.
III			:		:	id
IV			:		:	id
			:		:	assez nb.
			:		:	tb.
			:		:	hyp.nb.tb.
			:		:	id
			:		:	assez nb.tb.

c = confluenta.

TABLEAU VI.

<u>Vaccinés</u>						
ID	:	ID	:	BCG-test	:	Rate
14 mois	:	19 mois	:	20 mois	:	Foie
après V	:	après V	:	après V	:	Poumons
I	E	0	:	0	:	3granul.
II	+ f	0	:	0	:	0
III	0	0	:	0	:	6tb.
IV	E	0	:	0	:	9tb.
<u>Témoins</u>						
15 cobayes			:		:	très hyper.
			:		:	nb.tb.
			:		:	assez nb.tb.
			:		:	nb.gros tb.
			:		:	gros tb.
			:		:	gros tb.

Exp VII. — Cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Onze mois après, une I. D. puis un BCG-test sont pratiqués. Les animaux sont alors éprouvés ainsi que des cobayes neufs témoins par inoculation sous-cutanée de 0,001 mg de la souche bovine 1099. Sacrifiés deux mois après (tableau VII).

TABLEAU VII.

		<u>Vaccinés</u>			
	ID 11 mois après V	BCG-test : jours : suivants	Rate	Foie	Poumons
I	0	+	12tb.	0	6
II	0	+f	1tb.	0	0
III	0	E	1tb.	0	0
IV	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0
VI	+		0	0	0
VII	+		1 gros 1 petit tb	0	4tb.
			<u>Témoins:</u>		
15 cobayes			nb. gros tb.	nb. gros tb.	assez nb.tb.

Les cobayes vaccinés chez lesquels l'intradermo-réaction à la tuberculine est encore positive, ainsi que ceux dont le BCG-test est positif ou négatif, paraissent, onze mois après leur vaccination, conserver encore une résistance élevée, en particulier ceux qui ne réagissent plus aux corps bacillaires.

Nous avons résumé dans le tableau VIII les résultats que nous avons obtenus. Le degré de la résistance antituberculeuse est exprimé de la façon suivante (V. légende tableau VIII).

Il ressort des résultats de nos expériences résumés dans le tableau VIII que, pendant la période où les cobayes vaccinés par une injection intradermique ou sous-cutanée de BCG ont perdu la sensibilité à la tuberculine qu'ils avaient acquise par cette vaccination, mais réagissent encore positivement au BCG-test, ces animaux conservent la résistance antituberculeuse qu'ils présentaient précédemment. Ils ne paraît y avoir aucun doute sur ce point.

A partir du moment où les cobayes vaccinés par le BCG ne réagissent plus aux corps bacillaires, il semble que la résistance antituberculeuse de ces animaux puisse disparaître, mais dans d'autres cas elle se maintient encore. Nous avons pu observer sa persistance jusqu'au vingtième mois après la vaccination des cobayes par injection sous-cutanée de BCG, bien qu'ils aient cessé de réagir au BCG-test. L'extinction de l'infra-allergie n'est donc pas forcément le signe de la disparition de la résistance antituberculeuse. Ces faits permettent de penser que la résistance

TABLEAU VIII.

Numéro expérience	I	III	II	VII	IV	V	VI
Voie de vaccination	ID	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Délai entre vaccin. et épreuve virulente	12 mois	5 mois	7 mois	11 mois	15 mois	16 mois	20 mois
Intradermo	+	5R+++		2R+++		2R+++	
	0						
	+	3R+++	4R+++	3R+++	2R+++	1R++	
B.C.G.-test	0			3R+++	2R0	3R++	4R+++

R + + + = absence de lésions sur la rate, le foie et les poumons ou très rares tubercules sur ces organes.

R + + = assez nombreux tubercules sur les organes.

R + = lésions un peu moins nombreuses et importantes que chez les témoins, présentant sur tous leurs organes des lésions nombreuses et parfois confluentes.

antituberculeuse conférée par le BCG peut durer même après la disparition de l'allergie et de l'infra-allergie vaccinales. Ainsi pourraient être expliquées les observations faites par Aronson ainsi que par Wallgren chez des enfants vaccinés une seule fois par le BCG.

Nos observations apportent une nouvelle preuve de la dissociation qui existe entre la résistance antituberculeuse et non seulement l'allergie à la tuberculine mais aussi l'infra-allergie aux corps bacillaires complets.

#### CONCLUSIONS.

La résistance antituberculeuse conférée au cobaye par injection de BCG par les voies intradermique et sous-cutanée paraît durer pendant toute la période où ces animaux, après disparition de l'allergie tuberculinique vaccinale, restent sensibles aux corps bacillaires complets.

L'extinction de l'infra-allergie décelée par le BCG-test n'est pas forcément le signe de la disparition de la résistance antituberculeuse. Dans certains cas, les cobayes vaccinés par le BCG, qui ont cessé de réagir à la tuberculine et aux corps bacillaires, conservent une résistance antituberculeuse semblable à celle qu'ils avaient lorsqu'ils étaient allergiques ou infra-allergiques.

Ces faits permettent de penser que l'action préventive du BCG se prolonge beaucoup plus longtemps qu'on ne l'a cru au début de l'emploi de ce vaccin. Ils donnent une nouvelle preuve de la dissociation qui existe entre les phénomènes d'immunité et d'allergie, puisque cette dissociation peut être aussi constatée dans la période infra-allergique.

## SUMMARY

INFRA-ALLERGY DEMONSTRATED BY TOTAL BACTERIAL CELLS  
AND ANTI-TUBERCULOUS RESISTANCE DUE TO BCG.

The anti-tuberculous resistance following an intra-cutaneous or sub-cutaneous injection of BCG in guinea pigs seems to last as long as the animals remain sensitive to total bacterial cells after the disappearance of the tuberculinic allergy.

The disappearance of infra-allergy demonstrated by the BCG-test does not necessarily prove the disappearance of the anti-tuberculous resistance. In certain cases, guinea pigs which have been immunized with BCG and do not respond any more to tuberculin and to bacterial cells, still possess an anti-tuberculous resistance analogous to the one they presented when they were allergic or infra-allergic.

These facts suggest that the preventive action of BCG lasts much longer than was formerly thought. They evidence once more the dissociation between immunity and allergy, since this dissociation can also be observed in the infra-allergic period.

## BIBLIOGRAPHIE

- CALMETTE (A.), BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1921, **35**, 561 et 1922, **36**, 625.  
NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Bull. Acad. Méd.*, 1956, **140**, 224.  
NÈGRE (L.). *Prévention et traitement spécifiques par le BCG et par l'antigène méthylé. Etude de leurs modes d'administration et de leurs mécanismes d'action*, 1 vol., 242 p., Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1956.
-



**EFFET D'UN TRAITEMENT PRÉCOCE  
PAR L'ISONIAZIDE SUR L'IMMUNITÉ ENGENDRÉE  
CHEZ UN COBAYE  
PAR UNE DOSE DE BCG STANDARD FAIBLE.  
DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES  
SUR LE POUVOIR VACCINANT  
DU BCG ISONIAZIDO-RÉSISTANT**

par G. CANETTI, J. BRETEY, A. SAENZ fils  
et J. GROSSET (\*).

*(Institut Pasteur,  
Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose)*

Une expérience précédente a établi que, chez le cobaye vacciné par une forte dose de BCG standard, l'administration d'isoniazide commencée dès le jour de la vaccination n'empêche pas l'apparition d'une immunité anti-tuberculeuse satisfaisante : celle-ci n'est pas sensiblement plus faible que chez les témoins non traités par l'isoniazide [2]. L'expérience relatée aujourd'hui concerne l'immunité engendrée dans les mêmes conditions par une dose de BCG standard *faible*. Le résultat de cette expérience est très différent : le traitement précoce par l'isoniazide empêche le développement d'une immunité satisfaisante, lorsque la dose vaccinale est faible. Nous rapportons également une autre expérience, destinée à comparer à nouveau le pouvoir vaccinant du BCG standard et du BCG isoniazido-résistant employés à dose forte, en l'absence de tout traitement par l'isoniazide. Cette expérience confirme le pouvoir vaccinant satisfaisant du BCG isoniazido-résistant, déjà démontré ailleurs.

EXPÉRIENCE I. — *Immunité engendrée par une faible dose de BCG standard chez des cobayes soumis dès le jour de la vaccination à un traitement par l'isoniazide.*

(\*) Manuscrit reçu le 29 avril 1958.

A. VACCINATION ET ADMINISTRATION D'ISONIAZIDE. — La vaccination a porté sur un total de 98 cobayes, d'un poids de 500 à 700 g, répartis en quatre groupes et tous vaccinés le même jour.

Un premier groupe de 30 cobayes a reçu par injection intramusculaire, dans la cuisse droite,  $10^{-2}$  mg d'une culture de BCG *standard* sur pomme de terre glycinée, âgée de 20 jours. Des dilutions ensemencées sur milieux de Lœwenstein-Jensen ont montré la présence de  $2 \times 10^4$  unités bacillaires viables dans l'inoculat. Ces animaux ont été traités depuis le jour de la vaccination, et pendant quatre-vingt-quatre jours, par une injection quotidienne sous-cutanée de 10 mg d'isoniazide (groupe I).

Un second groupe de 24 cobayes a reçu la même injection vaccinale, mais n'a pas été soumis au traitement par l'isoniazide (groupe II). Ces deux groupes d'animaux apportent le renseignement essentiel de l'expérience : l'influence exercée par une chimiothérapie précoce sur le pouvoir immunisant d'une vaccination faible.

Un troisième groupe de 20 cobayes a reçu dans les mêmes conditions 1 mg de BCG *standard* ( $2 \times 10^6$  unités bacillaires viables) ; il n'a pas été soumis à un traitement par l'isoniazide. Ce groupe-témoin permet de situer le degré d'immunité engendré par une dose vaccinale aussi faible que  $10^{-2}$  mg de BCG (groupe III).

Enfin, un quatrième groupe de 24 cobayes a reçu dans les mêmes conditions  $10^{-2}$  mg de BCG *isoniazido-résistant*, provenant d'une culture sur milieu de Lœwenstein-Jensen contenant  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide, âgée de 18 jours. L'origine et les caractères de cette souche de BCG, qui est homogènement résistante à  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide, ont été décrits ailleurs [2]. L'inoculat contenait  $1 \times 10^4$  unités bacillaires viables. Les animaux n'ont pas été soumis à un traitement par l'isoniazide. Ce groupe-témoin a été institué pour évaluer le pouvoir vaccinant d'une faible dose de BCG *isoniazido-résistant*, comparativement à celui d'une dose semblable de BCG *standard* (groupe IV).

Au quatre-vingt-cinquième jour, c'est-à-dire le lendemain de l'arrêt de l'isoniazidothérapie (administrée au seul groupe I), tous les animaux des quatre groupes ont été éprouvés par voie intradermique par 10 unités de tuberculine purifiée I. P. 48.

B. SURINFECTION D'ÉPREUVE. — Trois jours plus tard, c'est-à-dire quatre-vingt-huit jours après la vaccination, tous les animaux des quatre groupes ont été surinfectés par voie intramusculaire (cuisse gauche) par la souche virulente H37Rv (culture en milieu liquide de Dubos âgée de 8 jours, diluée de telle manière que la dose inoculée soit, d'après une échelle opacimétrique, de

1/64 de milligramme de bacilles). Des ensemencements de dilutions ont montré que l'inoculat contenait environ  $65 \times 10^4$  unités bacillaires viables. Vingt-huit témoins neufs ont reçu la même injection virulente. Aucun animal n'a été soumis pendant l'évolution de l'infection d'épreuve à un traitement par l'isoniazide.

Tous les cobayes non morts d'une infection intercurrente, au nombre de 78, ont été sacrifiés cinquante-deux à soixante jours après l'infection d'épreuve, le jour moyen du sacrifice pour chaque groupe étant le cinquante-huitième. Les animaux morts spontanément pendant la même semaine ont également servi à l'évaluation de l'immunité vaccinale. Celle-ci a été mesurée à l'aide de trois critères : le *poids de la rate* ; le *coefficient lésionnel global* (lésions cotées de 0 à 5 pour la rate, le foie et les poumons respectivement, de 0 à 3 pour l'ensemble des ganglions locaux, soit un maximum possible de 18 par animal), et le *coefficient lésionnel viscéral* (même cotation que précédemment, avec exclusion des ganglions locaux : soit un maximum possible de 15 par animal). Les autopsies et la cotation des lésions ont été faites sans que le groupe auquel appartenait l'animal fût connu de l'opérateur.

C. RÉSULTATS. — Il y a lieu de confronter d'abord le groupe II, vacciné par  $10^{-2}$  mg de BCG standard, et le groupe III, vacciné par 1 mg de BCG standard, tous deux non traités par l'isoniazide. L'allergie déterminée par la vaccination est sensiblement la même dans les deux groupes (8,8 mm dans le groupe II, 8,5 mm dans le groupe III). L'immunité est légèrement plus forte dans le groupe III, l'atteinte isolée de la rate et le coefficient lésionnel global et viscéral y sont un peu plus faibles que dans le groupe II, mais la différence n'est pas significative. En l'absence d'un traitement par l'isoniazide, la vaccination par  $10^{-2}$  mg de BCG standard a donc entraîné une immunité qui, quatre-vingt-huit jours après la vaccination, n'apparaît pas sensiblement plus faible que celle entraînée par 1 mg de BCG standard (tableau I).

La comparaison essentielle s'établit entre le groupe I et le groupe II, tous deux vaccinés par  $10^{-2}$  mg de BCG standard, mais dont seul le premier a reçu le traitement précoce par l'isoniazide. *Tant pour l'allergie que pour l'immunité, ces deux groupes diffèrent profondément.* Dans le groupe I, l'allergie est pratiquement nulle (diamètre moyen des réactions à 10 unités de I. P. 48 : 2,8 mm, contre 8,8 mm dans le groupe II). L'immunité est également différente dans les deux groupes : le poids de la rate est de 5,6 g dans le groupe I, contre 2,1 g dans le groupe II ; le coefficient lésionnel global, de 11,4 contre 8,3 ; le coefficient lésionnel viscéral, de 9,9 contre 6,4. Toutes ces différences sont

significatives. Les atteintes du groupe I sont même un peu plus sévères que celles du groupe-témoin de la surinfection (groupe V) ; ce qui s'explique en partie par le fait que le nombre d'animaux morts de tuberculose avant la date du sacrifice, et de ce fait non utilisés pour l'évaluation de l'immunité, est plus élevé dans le groupe-témoin que dans le groupe I (4 animaux contre 1) ; leur inclusion tend à égaliser les chiffres des deux groupes. Ainsi, le

TABLEAU I. — Allergie et immunité constatées chez les cobayes des différents groupes de la première expérience.

	I	II	III	IV	V
Vaccination: souche <sup>(1)</sup>	BCG S.	BCG S.	BCGS	BCG Iso.	-
Dose (mg)	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	I	10 <sup>-2</sup>	-
Traitement par Iso <sup>(2)</sup>	+	-	-	-	-
Allergie <sup>(3)</sup> (mm)	2,8	8,8	8,5	9,1	-
Infection virulente <sup>(4)</sup>	+	+	+	+	+
Nombre d'animaux survivants <sup>(5)</sup>	14	14	12	18	20
Poids moyen <sup>(6)</sup>					
Avant surinfection	680	700	700	700	610
Lors du sacrifice	530	640	730	665	540
Variation (%)	-13	-9	+4	-5	-11
Atteinte macroscopique					
Rate (g)	5,6	2,1	1,3	2,4	4
Coef. lésionnel global <sup>(7)</sup>	11,4	3,3	7,2	8,4	9,5
Coef. lésionnel viscéral <sup>(7)</sup>	9,9	6,4	5,3	6,7	8

1, BCG S = BCG standard ; BCG Iso. = BCG isoniazido-résistant ; 2, 10 mg par jour, par voie sous-cutanée, pendant quatre-vingt-quatre jours ; 3, Recherche quatre-vingt-cinq jours après la vaccination, par 10 unités de I. P. 48 intradermique. Résultat à la quarante-huitième heure ; 4, Par  $65 \times 10^4$  bacilles de la souche H37Rv, injectés par voie intramusculaire, quatre-vingt-huit jours après la vaccination ; 5, Lors du sacrifice, cinquante-deux à soixante jours après la surinfection ; 6, Lésions cotées de 0 à 5 pour la rate, le foie et le poumon ; de 0 à 3 pour les ganglions locaux ; maximum possible : 18 ; 7, Même cotation que pour (6), avec exclusion des ganglions locaux ; maximum possible : 15.

traitement précoce par l'isoniazide a eu une influence profonde sur l'effet d'une vaccination par une faible dose de BCG standard : elle a empêché le développement de l'allergie et de l'immunité.

Il faut enfin confronter les groupes II et IV, le premier vacciné par 10<sup>-2</sup> mg de BCG standard, le second par 10<sup>-2</sup> mg de BCG



isoniazido-résistant, et tous deux non traités par l'isoniazide. Les résultats relevés dans ces deux groupes sont presque identiques, tant pour l'allergie que pour l'immunité (réactions tuberculiniques : 9,1 mm dans le groupe IV, 8,8 mm dans le groupe II ; poids de la rate : 2,4 g dans le groupe IV, 2,1 dans le groupe II ; coefficient lésionnel global : 8,4 contre 8,3 ; coefficient lésionnel viscéral : 6,7 contre 6,3). Ainsi, l'allergie et l'immunité engendrées par une dose faible de BCG isoniazido-résistant sont identiques à celles engendrées par une dose faible de BCG standard.

Le résultat essentiel de cette expérience est la démonstration, chez le cobaye, d'une action inhibitrice quasi totale exercée par un traitement immédiat à l'isoniazide sur l'effet sensibilisant et immunisant d'une vaccination faible.

EXPÉRIENCE II. — *Immunité engendrée par une dose forte de BCG isoniazido-résistant, comparativement à celle engendrée par une même dose de BCG standard.*

Deux groupes de 35 cobayes, d'un poids moyen de 500 à 700 g, sont vaccinés le même jour, l'un par 1 mg de BCG standard, l'autre par 1 mg de BCG isoniazido-résistant. La provenance des souches et la voie d'inoculation sont les mêmes que dans l'expérience précédente ; le nombre d'unités bacillaires viables contenu dans l'inoculat, calculé d'après l'ensemencement de dilutions appropriées, est de  $3 \times 10^6$  pour le BCG standard, et de  $1 \times 10^6$  pour le BCG isoniazido-résistant. Aucun animal n'est soumis à un traitement par l'isoniazide. L'allergie est recherchée quarante-deux jours après la vaccination, par injection intradermique de 10 unités I. P. 48. Au soixante-troisième jour, tous les animaux survivants, ainsi que 30 témoins neufs, reçoivent l'infection d'épreuve, qui consiste en l'injection, par voie intramusculaire, d'une culture de la souche H37Rv en milieu liquide de Dubos, âgée de 8 jours, et diluée de manière à contenir, selon une échelle opacimétrique, 1/20 de milligramme de bacilles par centimètre cube (dose inoculée,  $1,5 \times 10^6$  unités bacillaires viables à l'ensemencement). Tous les animaux non morts spontanément sont sacrifiés entre le soixante-quatorzième et le soixante-dix-huitième jour qui suit la surinfection. Les autopsies sont faites dans les mêmes conditions que celles de l'expérience précédente, et l'évaluation de l'immunité se fait selon les mêmes critères (poids de la rate, coefficient lésionnel global, coefficient lésionnel viscéral).

#### RÉSULTATS.

Les résultats d'ensemble de l'expérience sont consignés dans le tableau II. Ils montrent que l'allergie et l'immunité des deux groupes d'animaux vaccinés sont sensiblement les mêmes. Pour

ce qui est de l'allergie (quarante-deuxième jour), les réactions à 10 unités de tuberculine ont, à la quarante-huitième heure, un diamètre moyen de 10 mm chez les animaux vaccinés par le BCG isoniazido-résistant, de 8,9 mm chez ceux vaccinés par le BCG standard : la différence n'est pas significative. Les chiffres pour le poids de la rate, le coefficient lésionnel global et le coefficient lésionnel viscéral sont respectivement : 3,1, 9,2 et 7,6 g pour les

TABLEAU II. — Allergie et immunité constatées chez les cobayes des différents groupes de la deuxième expérience.

	I	II	
Vaccination: souche <sup>(1)</sup>	BCG S.	BCG Iso.	-
Dose (mg)	I	I	-
Allergie <sup>(2)</sup> ( mm )	8,9	10	-
Infection virulente <sup>(3)</sup>	+	+	+
Nombre d'animaux survivants <sup>(4)</sup>	24	20	13
Poids moyen (g)			
Avant surinfection	620	670	510
Lors du sacrifice	600	620	500
Variation	-3%	+3%	-18%
<u>Atteinte macroscopique moyenne</u>			
Rate (g)	3,1	3,1	8,9
Coef. Lésionnel global <sup>(6)</sup>	9,2	7,7	12,2
Coef. Lésionnel viscéral <sup>(7)</sup>	7,6	6,1	10,9

1, BCG S = BCG standard ; BCG Iso. = BCG isoniazido-résistant ; 2, Recherche quarante-deux jours après la vaccination, par 10 unités de I. P. 48 intradermique. Résultat à la quarante-huitième heure ; 3, Par  $1,5 \times 10^6$  bacilles de la souche H37Rv, injectés par voie intramusculaire soixante-trois jours après la vaccination ; 4, Lors du sacrifice, soixante-quatorze à soixante-dix-huit jours après la surinfection ; 6 et 7, voir la légende du tableau I.

vaccinés par le BCG standard ; 3,1, 7,7 et 6,1 g pour les vaccinés par le BCG isoniazido-résistant ; enfin, 5,8, 12,2 et 10,9 g pour les témoins (comme dans l'expérience précédente, les chiffres seraient encore plus élevés pour les témoins si l'on incluait les nombreux animaux de ce groupe morts de tuberculose avant la

date du sacrifice). Les différences entre vaccinés et témoins sont significatives ; celles qui existent entre les deux groupes de vaccinés ne le sont point. Ainsi, le pouvoir vaccinant des deux souches de BCG s'avère dans cette expérience sensiblement le même.

#### DISCUSSION.

Les expériences qui viennent d'être relatées apportent des renseignements sur deux problèmes distincts : le pouvoir vaccinant du BCG isoniazido-résistant, et l'influence exercée par une isoniazidothérapie précoce sur le pouvoir vaccinant du BCG standard.

Pour ce qui est du pouvoir vaccinant du BCG isoniazido-résistant, les deux expériences relatées ici, faites l'une avec  $10^{-2}$  mg, l'autre avec 1 mg, montrent que ce pouvoir a été identique à celui du BCG standard. Lors de l'expérience rapportée précédemment [2], où la surinfection était d'ailleurs moins forte, une différence appréciable existait en faveur du BCG isoniazido-résistant. Il se peut que les passages ininterrompus sur milieu de Løwenstein-Jensen à l'isoniazide ( $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) entre les deux séries d'expériences, espacées de sept mois, aient légèrement diminué le pouvoir vaccinant de la souche. La souche de BCG isoniazido-résistant employée par Schaefer, Cohn et Middlebrook [7] a donné à ces auteurs des résultats un peu inférieurs à ceux du BCG standard. On ne peut exclure qu'il n'y ait déjà initialement de légères différences de pouvoir immunisant entre diverses souches de BCG isoniazido-résistant sélectionnées dans différents laboratoires ; et le meilleur mode d'entretien de ces souches, respectant à la fois leur résistance et leur pouvoir vaccinant, reste à préciser. A l'heure actuelle, notre souche n'est plus entretenue sur milieu à l'isoniazide ; sa résistance n'a point baissé. Il reste à savoir si la diminution de son pouvoir vaccinant est arrivée à son terme.

Pour ce qui est des effets inhibiteurs d'une isoniazidothérapie précoce sur le pouvoir vaccinant du BCG standard, les résultats rapportés ici démontrent que, lorsque la dose de BCG inoculée est faible, ces effets sont des plus prononcés. Chez des cobayes vaccinés par  $10^{-2}$  mg de BCG standard et traités depuis le jour de la vaccination par l'isoniazide, *l'allergie et l'immunité sont pratiquement nulles après douze semaines de traitement* : les témoins non traités par l'isoniazide disposent à ce moment d'une allergie et d'une immunité très importantes. Cet effet inhibiteur de l'isoniazide ne s'observe pas lorsque la dose de BCG est forte, ainsi que nous l'avons montré précédemment : l'allergie de cobayes vaccinés par 1 mg de BCG standard, et traités pendant douze semaines, est certes plus faible que celle des témoins non traités,

mais elle n'est pas nulle ; surtout, l'immunité ne diffère pas de manière significative de celle des témoins. Le même état de choses, pour ce qui est de l'immunité, a été observé chez la souris par Dubos et Pierce [5], ainsi que par Bloch [4] : l'isoniazide n'inhibe pas le développement de l'immunité lorsque l'injection vaccinale est forte, mais elle l'inhibe complètement lorsque l'injection vaccinale est faible. Les raisons pour lesquelles une vaccination forte n'est point sensiblement influencée par l'isoniazidothérapie ont été examinées précédemment [2].

Le problème important est de savoir quels effets une isoniazidothérapie précoce exerce sur le développement de l'immunité vaccinale chez l'homme. Dans l'expérience relatée ici, la dose de BCG inoculée au cobaye est du même ordre de grandeur que celle employée lors de la vaccination intradermique de l'enfant, compte tenu de la différence de poids. Mais cet état de choses ne permet pas de conclure avec certitude que l'immunité engendrée chez l'homme serait d'intensité similaire, et, partant, que l'action inhibitrice de l'isoniazidothérapie précoce sur l'immunité atteindrait le même degré. On peut simplement admettre qu'au-dessous d'un certain seuil, l'immunité vaccinale de l'homme serait elle aussi inhibée par l'administration précoce d'isoniazide. A cet égard, l'étude de l'allergie est d'un intérêt certain. Bien qu'il n'y ait pas parallélisme étroit entre l'allergie et l'immunité consécutives à la vaccination, le comportement de l'allergie sous isoniazide constitue un indice d'une grande importance, et d'ailleurs le seul que l'on puisse explorer directement chez l'homme.

Les effets d'une isoniazidothérapie précoce sur le développement de l'allergie vaccinale chez l'homme ont été encore peu étudiés, et les faits observés ne sont pas tout à fait concordants. Chorémis et ses collaborateurs [4] observent, chez 19 enfants vaccinés par voie intradermique et traités aussitôt par 4 à 6 mg par kilogramme d'isoniazide, dix-huit fois des réactions négatives à 10 unités de PPD après onze semaines de traitement. Chez 10 enfants, chez lesquels le traitement n'est commencé qu'une semaine après la vaccination, il y a 8 réactions négatives. Chez les 13 témoins vaccinés et non traités, toutes les réactions sont à cette date positives. Un mois après l'arrêt du traitement, qui a duré onze semaines, les réactions, refaites chez 6 enfants, sont toujours négatives. Un autre groupe de 11 enfants est vacciné par voie intradermique à deux reprises, à un mois d'intervalle ; l'isoniazide est administré dès la première vaccination ; des intradermo-réactions à 10 unités de PPD sont faites à trois reprises : quatre semaines après la première vaccination, une semaine et quatre semaines après la seconde vaccination. Sauf un enfant, faiblement positif lors de la dernière tuberculination, toutes les réactions restent négatives, alors qu'elles sont positives chez 11 enfants témoins identiquement vaccinés à deux reprises, mais non traités. De plus, les réactions locales, lors de la seconde vaccination, sont beaucoup moins étendues



chez les enfants traités que chez les témoins. Enfin, dix mois après la seconde vaccination, c'est-à-dire neuf mois après l'arrêt du traitement, les réactions, refaites chez 7 enfants, sont négatives dans 5 cas.

Chez l'adulte, Palitz [6] observe une action inhibitrice moindre de l'isoniazidothérapie précoce. Trente sujets, négatifs à 0,1 mg de vieille tuberculine, sont vaccinés par voie intradermique, puis traités continuellement pendant cinq mois et demi par 600 mg d'isoniazide. Après ce traitement, 20 p. 100 des sujets réagissent à 0,1 mg de vieille tuberculine, et 80 p. 100 à 1 mg, contre 54 p. 100 et 100 p. 100 respectivement chez 14 témoins vaccinés et non traités. De plus, les réactions positives à l'une et l'autre dilution de tuberculine sont moins étendues chez les sujets traités que chez les sujets non traités. Le traitement est arrêté trois mois plus tard, et l'allergie est recherchée après sept mois et demi d'interruption, c'est-à-dire seize mois après la vaccination ; à ce moment, sur 23 sujets traités et réévalués, on trouve dans 9 p. 100 des cas une réaction positive à 0,1 mg et dans 78 p. 100 des cas une réaction positive à 1 mg (contre 20 p. 100 et 80 p. 100 précédemment) ; la chute de l'allergie est donc très modérée.

Ainsi, chez l'homme, l'isoniazidothérapie précoce inhibe indiscutablement le développement de l'allergie vaccinale ; mais le degré d'inhibition varie selon les observations. De nouvelles études, faites sur des cas plus nombreux, sont nécessaires pour préciser davantage ce phénomène très important. Dans les cas où l'effet inhibiteur sur l'allergie est particulièrement prononcé, il est probable que le développement de l'immunité est lui aussi fortement inhibé, comme il l'est dans l'étude expérimentale rapportée ici. De pareils cas justifieraient l'emploi du BCG isoniazido-résistant, tout au moins lorsque les circonstances épidémiologiques [3] sont telles qu'elles exigent la mise en œuvre simultanée de la vaccination par le BCG et de la chimioprophylaxie par l'isoniazide.

#### RÉSUMÉ.

Deux expériences sont rapportées, l'une concernant l'influence exercée par une isoniazidothérapie précoce sur le pouvoir vaccinant d'une dose faible de BCG standard, l'autre le pouvoir vaccinant du BCG isoniazido-résistant. Chez des cobayes vaccinés par  $10^{-2}$  mg de BCG standard et traités depuis le jour de la vaccination, et pendant quatre-vingt-quatre jours, par 10 mg d'isoniazide, l'allergie et l'immunité vaccinales sont nulles ; ces cobayes se comportent à l'égard d'une surinfection virulente comme des témoins non vaccinés. Le pouvoir vaccinant du BCG isoniazido-résistant, inoculé au cobaye à la dose de  $10^{-2}$  mg et de 1 mg, est actuellement identique à celui du BCG standard employé aux mêmes doses.

## SUMMARY

EFFECT OF EARLY ISONIAZIDO-THERAPY ON THE IMMUNITY  
INDUCED IN GUINEA PIGS BY A SMALL DOSE OF STANDARD BCG.

FURTHER DATA ON THE IMMUNIZING CAPACITY  
OF ISONIAZIDO-RESISTANT BCG.

Two experiments are described : the first one on the influence of an early isoniazido-therapy on the immunizing capacity of a small dose of standard BCG ; the second one on the immunizing capacity of the isoniazido-resistant BCG.

In guinea-pigs immunized with  $10^{-2}$  mg of standard BCG, treated from the day of immunization and during eighty-four days with 10 mg isoniazid, there is no vaccinal allergy nor immunity ; these guinea pigs behave towards a virulent superinfection like the non immunized controls.

The immunizing capacity of the isoniazido-resistant BCG inoculated into guinea pigs at doses of  $10^{-2}$  mg and 1 mg is identical to the one of the standard BCG used at the same doses.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLOCH (H.). Communication personnelle.
  - [2] BRETEY (J.) et CANETTI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 441.
  - [3] CANETTI (G.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1392. *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, Suppl., 13.
  - [4] CHOREMIS (C.), LIACACOS (D.), ALLAMANIS (J.), ZOUMBOULAKIS (D.) et KOURTI (H.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, Suppl., 197.
  - [5] DUBOS (R. J.) et PIERCE (C. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 699.
  - [6] PALITZ (L. S.). *Am. Rev. Tub.*, 1958, **77**, 232.
  - [7] SCHAEFER (W.), COHN (M.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 656.
-

# RECHERCHES SUR LE MÉCANISME D'ATTÉNUATION DU POUVOIR PATHOGÈNE DES VARIANTES ISONIAZIDO-RÉSISTANTES DU BACILLE TUBERCULEUX

par M. NASTA, E. PAUNESCO et P. GEORGESCO (\*).

*(Institut de Phthisiologie,  
Sos. Viiilor 90, Bucarest, Roumanie)*

Le fait que les variantes du bacille tuberculeux, ayant acquis l'isoniazido-résistance [1, 2, 3, 4], subissent une atténuation de leur pouvoir pathogène, crée des conditions favorables pour l'analyse des facteurs responsables du pouvoir pathogène, une même souche microbienne pouvant être étudiée à l'état pathogène ou atténué.

Il est bien connu, depuis les travaux de Middlebrook, que cette atténuation va de pair avec d'importantes modifications métaboliques, entre autres la diminution, même la perte, du pouvoir catalasique, ainsi que l'apparition de nouvelles exigences nutritives, ayant comme conséquence, un ralentissement du développement des bacilles isoniazido-résistants dans certains milieux.

Middlebrook considère ce retard de développement, ainsi que la grande sensibilité vis-à-vis de l' $H_2O_2$ , due à l'absence de catalase, comme les principaux facteurs de l'atténuation de ces variantes. Il est possible, cependant, qu'il existe d'autres causes de leur atténuation.

La perte de la catalase n'est pas la seule modification qu'elles subissent : on a signalé, en même temps, une perte de l'activité peroxydasique [5], ainsi qu'une déficience globale des processus d'oxydo-réduction [4, 6]. Il nous a paru intéressant de rechercher si ces modifications du métabolisme, et peut-être d'autres encore inconnues, n'entraînaient pas des changements dans la structure quantitative ou qualitative de certains constituants du bacille. Nous pensons spécialement aux différents éléments auxquels on attribue l'action cytotoxique du bacille intégral (Borrel [7]. Metal-

(\*) Manuscrit reçu le 21 avril 1958.

nikov [8]) et qui ont été identifiés comme appartenant aux constituants lipidiques : fractions acétono-solubles (Boquet et Nègre [8 bis], Machebœuf [9], Fethke [10]), le cord factor (Bloch [11]), le lipo-polysaccharide Pmko (Choucrout [12]), la cire D et ses lipo-polysaccharides (Asselineau [13]), lipides totaux (Ionesco-Mihaiesi [14]), etc.

Une première étape de nos recherches a été l'étude comparative du pouvoir cytotoxique des bacilles sensibles et virulents, et des bacilles résistants atténués, à l'état intégral, vis-à-vis des leucocytes du cobaye.

# I. ACTION COMPARÉE DES BACILLES INH-RÉSISTANTS ET SENSIBLES VIS-A-VIS DES POLYNUCLÉAIRES DU COBAYE [15].

Une suspension de polynucléaires, obtenue de l'exsudat péritonéal du cobaye, sept à huit heures après l'injection d'eau peptonée, est mise en contact avec des émulsions, à concentration égale, de bacilles sensibles (souche H37Rv et BCG) et avec leurs variantes résistantes à 10 µg d'INH par millilitre. Le mélange est maintenu, sous agitation continue, à 37°, des échantillons étant prélevés à différents intervalles de temps, en vue de l'examen microscopique.

Après cent vingt minutes de contact, 40 p. 100 environ des leucocytes avaient phagocyté des bacilles (en moyenne 5 par leucocyte), le nombre des bacilles isoniazido-résistants phagocytés étant légèrement supérieur à celui des bacilles sensibles (coloration Ziehl-Neelsen).

Les altérations des leucocytes ayant phagocyté se traduisent par la vacuolisation excessive de leur protoplasme, l'hypertrophie et l'aspect oedémateux du noyau, ainsi que l'effacement du dessin chromatinien (coloration Giemsa), qui sont plus importants chez les leucocytes ayant phagocyté plusieurs bacilles.

Les modifications subies par d'autres propriétés des leucocytes : diminution de la mobilité [migration vers les particules d'amidon] (Delaunay [16]) et de la viabilité (1) [faculté de fixer les colorants vitaux] (H. Stähelin [17]) sont plus prononcées chez les leucocytes ayant englobé des bacilles sensibles (fig. 1).

De plus, si après le contact avec les deux variantes, résistante et sensible à l'INH du bacille tuberculeux, les leucocytes sont mis en présence d'un staphylocoque doré Oxford, le pouvoir

(1) Des variations appréciables de la faculté de fixer les colorants vitaux peuvent être décelées seulement si le milieu biologique initial (sérum ou exsudat péritonéal) est dilué et son pouvoir tamponnant diminué.



phagocytaire vis-à-vis de ce germe est réduit pour tous les leucocytes ayant phagocyté des bacilles. La réduction est plus importante pour les leucocytes ayant phagocyté des bacilles sensibles et virulents, que pour ceux qui avaient englobé la variante isoniazido-résistante atténuée (fig. 1).

Ces différences sont valables aussi pour le BCG sensible et résistant, compte tenu du fait que le BCG sensible, plus atténué que le bacille virulent isoniazido-résistant, possède déjà une action cytotoxique plus réduite que ce dernier et qui diminue encore avec l'acquisition de la résistance à l'INH (tableau I).

Une fois établie cette différence de toxicité du corps microbien

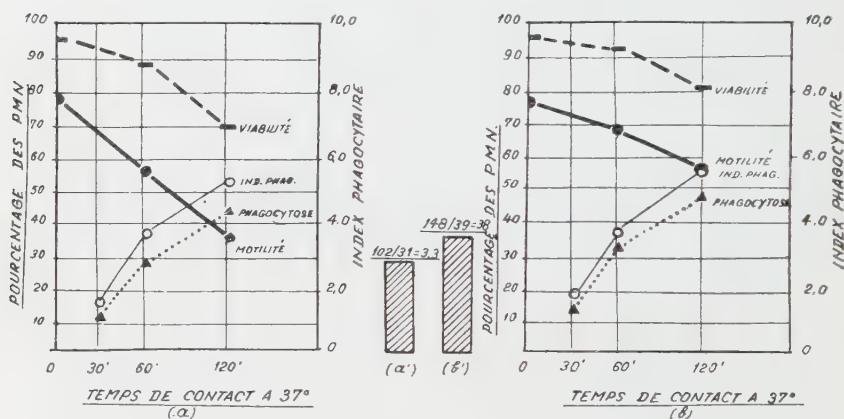


FIG. 1. — Modifications subies par les leucocytes polynucléaires après contact à 37° avec les bacilles H37Rv sensibles (a) et isoniazido-résistants (b). Au centre sont représentés les index phagocytaires, vis-à-vis du staphylocoque doré Oxford, des leucocytes ayant préalablement phagocyté les bacilles tuberculeux H37Rv sensible (a') ou résistant (b'). PMN = polynucléaires (« polymorphonucléaires »).

intégral des deux variantes vis-à-vis du polynucléaire, nous avons entrepris la recherche de l'action cytotoxique des différents constituants lipidiques, provenant de ces deux variantes.

## II. ACTION COMPARÉE DES CONSTITUANTS LIPIDIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX ISONIAZIDO-SENSIBLE, ET DE SA VARIANTE RÉSISTANTE, VIS-A-VIS DES POLYNUCLÉAIRES DU COBAYE [15].

Par la méthode de Macheboëuf [18] d'extractions successives à froid, nous avons obtenu, à partir des bacilles sensibles et résistants à l'INH, les fractions lipidiques suivantes : acétono-soluble, éthéro-, méthanol- et éthanolo-soluble.

Des suspensions en eau physiologique de ces fractions ont été

TABLEAU I. — Action des différentes souches de B. K. phagocytés, sur les propriétés physiologiques des polynucléaires (PN) du cobaye normal, après deux heures de contact à 37°C.

Bacille phagocyté:	% PN mobiles	% PN viables	Après 60m de contact avec le staphylocoque doré Oxford:	
			% PN qui ont phagocyté	Le rapport entre: nombre des staphyl. englobés et nombre des PN qui ont phagocyté.
H <sub>37</sub> Rv	38,5	73	32,5	$\frac{138}{32,5} = 4,2$
H <sub>37</sub> Rv R. 5 INH	54	81,5	40,5	$\frac{243,5}{40,5} = 6,0$
BCG	57	86,5	39	$\frac{256}{39} = 6,6$
BCG R. 10 INH	73,5	94,5	43,5	$\frac{328}{43,5} = 7,1$
Témoin (solution physiologique)	76	97,5	46,5	$\frac{369,5}{46,5} = 7,9$

mises en contact avec des polynucléaires, leur action étant appréciée, comme dans les expériences précédentes, par les modifications de la mobilité, de la viabilité, du pouvoir phagocytaire vis-à-vis du staphylocoque, et de leur aspect morphologique (tableau II).

TABLEAU II. — Action des fractions lipidiques extraites du BCG (concentration finale, 5 mg/ml) sur les propriétés physiologiques des polynucléaires (PN) du cobaye normal, après deux heures de contact à 37°C.

La fraction mise en contact avec les PN:	% PN mobiles	% PN viables	Après 60m de contact avec le staphylocoque dore Oxford:	
			% PN qui ont phagocyté	Le rapport entre: nombre des staphyl. englobés et nombre des PN qui ont phagocyté.
La fraction acétono-soluble.	29	69,5	37,5	$\frac{168}{37,5} = 4,4$
La fraction éthéro-soluble.	62	96,5	61	$\frac{311,5}{61} = 5,1$
La fraction méthanol-soluble.	75,5	89,5	50,5	$\frac{297}{50,5} = 5,9$
La fraction éthanol-soluble.	64	92,5	48,5	$\frac{338,5}{48,5} = 6,9$
Témoin (solution physiologique)	73,5	91	58,5	$\frac{336}{58,5} = 5,7$

Des données présentées dans le tableau II, il résulte que seule la fraction acétono-soluble s'est montrée pourvue d'action cytotoxique pour les leucocytes ; les fractions éthéro-soluble, méthanol- et éthanolo-soluble semblent avoir plutôt une action stimulante sur la phagocytose. Il s'agit probablement d'un effet tensio-actif, dont témoigne l'aspect « d'étalement » des leucocytes soumis à l'action de ces extraits. L'aspect « d'étalement » se produit également sous l'action de l'extrait acétono-soluble, ce qui semble montrer que, en dehors de son action toxique, cet extrait exerce lui aussi un effet tensio-actif.

Une fois établie cette action cytotoxique de l'extrait acétono-soluble, il restait à voir s'il existe une différence d'intensité entre l'action cytotoxique de l'extrait provenant des bacilles isoniazido-sensibles et celui provenant de la variante isoniazido-résistante.

A cette fin, nous avons mis en contact des leucocytes du cobaye normal avec des concentrations de 10 mg, 5 mg et 1 mg par millilitre de lipides acétono-solubles provenant des quatre souches : H37Rv sensible, H37Rv résistante, BCG sensible et BCG résistante (tableau III).

TABLEAU III. — Action de la fraction lipidique acétono-soluble (concentration finale, 1 mg/ml) des différentes souches, virulentes et atténuées de B.K., sur les propriétés physiologiques des polynucléaires (PN) du cobaye normal, après deux heures de contact à 37° C.

Provenance de la fraction acétono-soluble :	% PN mobiles	% PN viables	Après 60m de contact avec le staphylocoque doré Oxford :	
			% PN qui ont phagocyté	Le rapport entre : nombre des staphyl. englobés et nombre des PN qui ont phagocyté.
H <sub>37</sub> Rv	32,5	66,5	40	$\frac{216,5}{40} = 5,4$
H <sub>37</sub> Rv R. 5 INH	53	79,5	52,5	$\frac{421}{52,5} = 8,0$
BCG	59,5	77	49,5	$\frac{364,5}{49,5} = 7,3$
BCG R. 10 INH	87	97,5	63	$\frac{586,5}{63} = 9,3$
Témoin (solution physiologique)	81,5	93,5	60,5	$\frac{562}{60,5} = 9,2$

Le tableau III montre qu'il existe une différence nette entre l'action toxique des lipides extraits des bacilles H37Rv sensibles et virulents et celle des bacilles H37Rv résistants à l'INH et

atténués, différence qui est particulièrement évidente lorsqu'il s'agit de faibles concentrations (1 mg par millilitre). Quant au BCG, plus atténué que le H37Rv résistant, l'action cytotoxique est plus réduite que celle de ce dernier, mais subit encore une réduction du fait de l'isoniazido-résistance.

Par conséquent, comme l'avaient laissé prévoir les expériences avec le corps bactérien intégral, l'atténuation des bacilles, conséquence de l'isoniazido-résistance, ou d'autres mécanismes (BCG), va de pair avec une diminution de toxicité pour les leucocytes de l'extrait lipidique acétono-soluble de ces bacilles.

Le rôle des leucocytes dans la défense anti-infectieuse n'est pas limité à l'aspect purement mécanique de l'englobement des microbes ; il comprend aussi une action bactéricide de certains de leurs enzymes. On peut obtenir, à partir des polynucléaires, le lysozyme par extraction saline au NaCl 0,45 p. 100 et l'extrait ribonucléasique (Gengou), par extraction acide à l'HCl N/10, l'un et l'autre doués de pouvoir bactéricide vis-à-vis de certains germes, tel que *Micrococcus lysodeikticus* et *Staphylococcus citreus*.

On peut mettre en évidence ce pouvoir bactéricide en ensemençant sur gélose I goutte d'une culture de 17 heures du germe en question, après contact pendant une heure à 37° avec l'un de ces extraits (Mesrobianu et coll. [20]). Pour la détermination quantitative, on fait des dilutions des extraits leucocytaires et l'on considère comme *titre bactéricide* le dénominateur de la plus faible dilution qui a provoqué la stérilisation de la suspension microbienne après contact d'une heure à 37°. Un tube ensemenché avec la même suspension microbienne en eau physiologique sert de témoin.

Il était donc intéressant d'étudier l'action des extraits bacillaires acétono-solubles vis-à-vis des deux éléments bactéricides contenus dans les polynucléaires.

D'autre part, comme l'organisme infecté subit très tôt le changement de réactivité allergique (hypersensibilité et résistance), il était intéressant de connaître la manière de réagir, sous l'action du lipide acétono-soluble, non seulement des leucocytes provenant d'un animal normal, mais encore de ceux d'un animal en état d'allergie (vacciné par injection à trois reprises de 8 mg de BCG à quarante-cinq jours d'intervalle).

Enfin, nous avons considéré qu'il était important d'étudier le comportement des leucocytes dans ces deux conditions (leucocytes provenant d'un animal normal et d'un animal vacciné), non seulement vis-à-vis des extraits lipidiques acétono-solubles, mais encore vis-à-vis d'autres constituants du bacille, la tuberculine et son polysaccharide.



### III. ACTION DE CERTAINS CONSTITUANTS DU BACILLE TUBERCULEUX VIS-A-VIS DU POTENTIEL BACTÉRICIDE DES POLYNUCLÉAIRES DU COBAYE NORMAL ET DU COBAYE VACCINÉ AU BCG [49].

L'exsudat péritonéal, avant d'être soumis à l'extraction acide ou saline, est préalablement mis en contact, sous agitation continue, pendant quatre à six heures à 37°, avec les différents constituants du bacille tuberculeux : la tuberculine, le polysaccharide tuberculinique et la fraction lipidique acétono-soluble. Ce n'est qu'ensuite qu'on ajoute, aux extraits leucocytaires, comme il a été décrit précédemment, l'émulsion microbienne. Nous avons considéré, comme *index d'activité*, la valeur du rapport entre le taux bactéricide de chacun des extraits leucocytaires ainsi traités, et le taux bactéricide d'un extrait provenant des leucocytes

TABLEAU IV. — Action de certains constituants du bacille H37Rv sur le pouvoir bactéricide des PN du cobaye normal et vacciné au BCG.

		PN du cobaye normal mis en contact avec.*				PN du cobaye vacciné mis en contact avec.**			
		Solution saline physiologique	Tuberculine	Polysaccharide tuberculinique	Fraction lipidique acétono-soluble	Solution saline physiologique	Tuberculine	Polysaccharide tuberculinique	Fraction lipidique acétono-soluble
Extrait acide:	Titre bactéricide*	240	210	270	45	210	120	150	105
	Index d'activité	1,0	0,88	1,13	0,18	1,0	0,57	0,71	0,50
Extrait salin:	Titre bactéricide*	90	90	180	15	180	75	120	105
	Index d'activité	1,0	1,0	2,0	0,15	1,0	0,58	0,66	0,58

\* Titre bactéricide pour 1 ml suspension de *Micrococcus lysodeikticus* (à 3 mg de corps microbiens secs par millilitre). \*\* Pour chaque volume de suspension correspondant à 100 mg d'extrait sec de leucocytes on a ajouté : 1 ml de tuberculine brute, 0,2 mg de polysaccharide tuberculinique, 0,5 mg de lipide acétono-soluble.

témoins, en suspension dans l'eau physiologique (tableau IV et fig. 2).

Comme on peut le constater d'après le tableau IV et la figure 2, il résulte de cette expérience que :

Le potentiel bactéricide des leucocytes du cobaye normal n'est presque pas diminué sous l'action de la tuberculine ; il est activé par le contact avec le polysaccharide et puissamment inhibé par la fraction acétono-soluble.

Le potentiel bactéricide des leucocytes du cobaye vacciné au BCG est notablement diminué sous l'action de la tuberculine et de son polysaccharide ainsi que du lipide acétono-soluble, mais la diminution sous l'action de ce dernier est de beaucoup inférieure à celle subie par le potentiel bactéricide du leucocyte provenant d'un cobaye normal.

D'autre part, il est à remarquer (tableau IV) qu'il y a une différence de comportement entre les deux principes bactéricides, extrait salin (lysozymique) et extrait acide (ribonucléasique). Alors que l'extrait salin (lysozyme) provenant des leucocytes de l'animal vacciné est beaucoup plus actif que celui provenant des

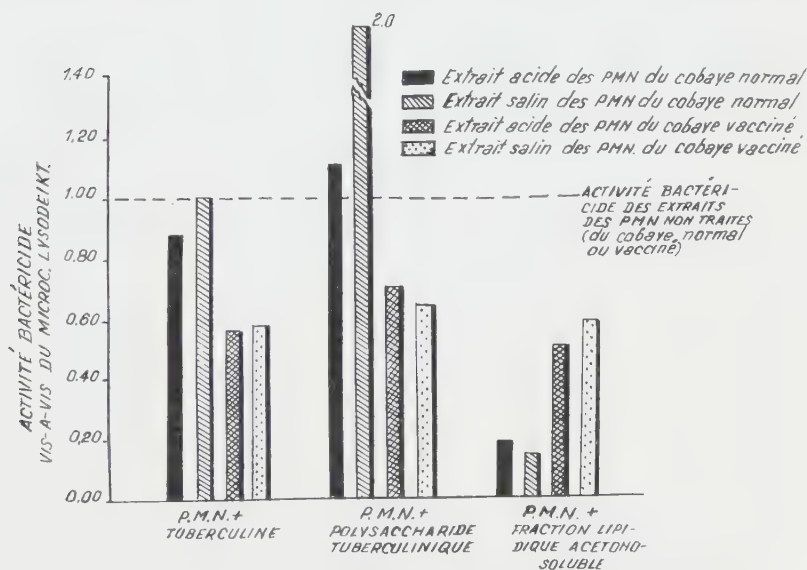


FIG. 2. — Action de certains constituants du bacille tuberculeux H37Rv vis-à-vis du pouvoir bactéricide des leucocytes polynucléaires du cobaye normal et du cobaye vacciné au BCG. L'action bactéricide des extraits des PN est rapportée à l'unité représentée par l'activité bactéricide des leucocytes témoins, provenant du cobaye normal.

leucocytes d'un animal normal, l'extrait ribonucléasique ne varie pas en intensité avec l'origine des leucocytes.

De même, le contact avec le polysaccharide ne détermine que l'activation de l'extrait salin (2) [lysozymique], alors que l'extrait acide (ribonucléasique) ne subit pas de modifications.

(2) G. P. Kerby [21] a signalé l'augmentation de l'activité lysozymique des polynucléaires humains en contact avec des substances pyrogènes ou des polysaccharides d'origine bactérienne.

Enfin, si la fraction lipidique acétono-soluble exerce une action inhibitrice sur le pouvoir bactéricide des leucocytes provenant de l'animal normal, et, à un degré moindre, celui des leucocytes de l'animal allergique, la tuberculine (3) et son polysaccharide, par contre, sont actifs vis-à-vis des leucocytes de l'animal allergique seulement.

Il s'agit donc, pour le lipide, d'une toxicité propre, indépendante des réactions d'hypersensibilité déclenchées par la tuberculine et le polysaccharide. Ceci concorde d'ailleurs avec l'absence généralement reconnue de propriétés antigéniques des lipides, dont une seule fraction, la cire D, en serait pourvue (E. F. O'Neill et C. B. Favour [23]).

Enfin, il y a lieu de remarquer encore que les leucocytes de l'animal immunisé sont doués, non seulement d'une plus grande résistance vis-à-vis de l'action toxique du lipide acétono-soluble, mais en outre d'une action bactéricide (lysozyme) supérieure à celle des leucocytes de l'animal normal.

Ici encore, nos résultats sont corroborés par les constatations des auteurs [17, 23, 30] qui ont trouvé que les tissus des animaux immunisés contre la tuberculose se caractérisent par une augmentation d'intensité de leur activité enzymatique générale et par l'acquisition de nouvelles propriétés enzymatiques adaptées, entre autres, aux substances à structure lipidique.

#### IV. ACTION COMPARÉE DE LA FRACTION LIPIDIQUE ACÉTONO-SOLUBLE EXTRAITE DES BACILLES TUBERCULEUX SENSIBLES ET ISONIAZIDO-RÉSISTANTS VIS-A-VIS DU POTENTIEL BACTÉRICIDE DES LEUCOCYTES DU COBAYE NORMAL ET DU COBAYE VACCINÉ AU BCG [22].

Cette recherche nécessitant une appréciation quantitative plus précise, nous avons introduit dans notre schéma expérimental, en dehors des épreuves déjà utilisées au cours des expériences précédentes, le dosage biochimique des activités ribonucléasique et lysozymique.

*Dosage de l'activité ribonucléasique* (méthode de Kunitz). — 1 ml d'extrait leucocytaire acide est mis en contact avec 2 ml de solution d'acide ribonucléique en tampon phosphate 0,1 M à pH 6, contenant 0,5 mg de phosphore total par millilitre. Après soixante minutes à 37°, on effectue le dosage du phosphore acido-soluble libéré, par la méthode photolorimétrique de Briggs. On soustrait, des chiffres ainsi obtenus,

(3) L'inhibition du développement des cultures de monocytes d'un animal sensibilisé et leur lyse ultérieure au contact de la tuberculine sont des faits bien connus (J. D. Aronson, 1933 ; J. K. Moen, 1936 ; D. H. Heilman, 1944 ; E. F. O'Neill, C. B. Favour, 1955 ; H. Stähelin, E. Suter, M. L. Karnowsky, 1956).

la valeur donnée par un dosage similaire, effectué sur un mélange d'acide ribonucléique et d'extrait leucocytaire inactivé à 100°. La différence obtenue représente la quantité réelle de phosphore mis en liberté par millilitre d'extrait leucocytaire acide. Les résultats sont exprimés en unités ribonucléasiques contenues dans 1 ml d'extrait, en considérant comme unité ribonucléasique la quantité d'enzyme capable de mettre en liberté 1  $\mu$ g de phosphore acido-soluble.

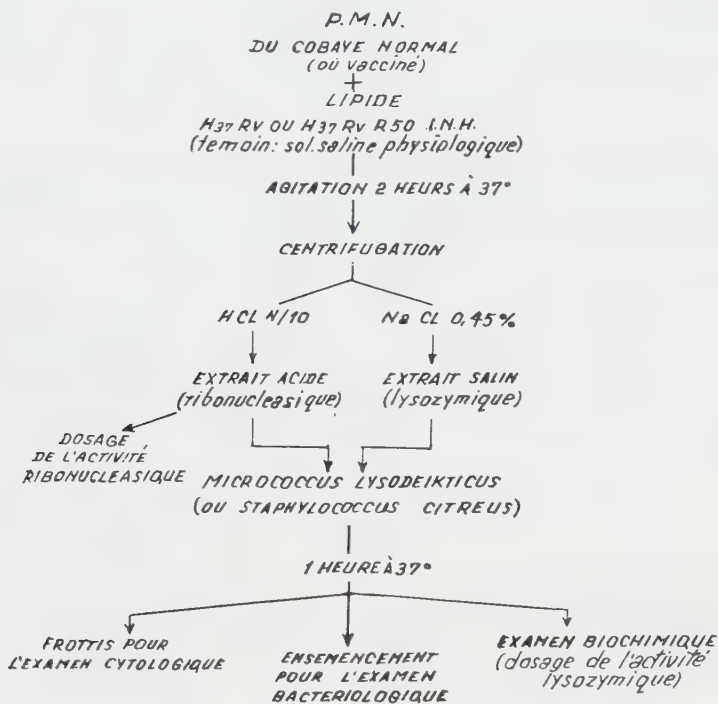


FIG. 3. — Succession des opérations de l'expérience réalisée pour l'étude de l'action de la fraction lipidique acétone-soluble extraite des bacilles sensibles et résistants à l'INH vis-à-vis des leucocytes du cobaye normal et vacciné au BCG.

**Dosage de l'activité lysozymique.** — A 5 ml d'un mélange contenant 2 parts de suspension microbienne (à 5 mg de corps microbiens secs par millilitre) et 4 parts d'extrait salin dilué 1/3, on ajoute, après contact d'une heure à 37°, 10 ml de déféquant pour sucres (1 vol. NaOH n/10 et 5 vol.  $\text{SO}_4\text{Zn}$  à 0,45 p. 100). Après défécation à chaud et élimination du précipité par filtration, on procède au titrage iodométrique des sucres réducteurs par la méthode de Hagedorn-Jensen. Parallèlement, on effectue une détermination similaire sur un mélange préparé extemporanément, de suspension microbienne et d'extrait leucocytaire. En partant de la différence obtenue, on calcule la quantité



de sucre libéré sous l'action de l'extrait salin respectif. L'activité lysozymique a été exprimée en milligrammes de glucose libéré par 100 mg de corps microbiens desséchés, sous l'action de 1 ml d'extrait leucocytaire salin.

Cette méthode, utilisée par Mesrobianu et coll. [20], est fondée sur le fait constaté par Hallauer [36] et confirmé par Meyer, Dubos, etc., que l'action du lysozyme sur le polysaccharide de la membrane microbienne se traduit par une mise en liberté *in vitro* d'un tiers des substances réductrices qu'on peut mettre en évidence et doser par les méthodes courantes.

La marche des opérations est présentée par la figure 3 et les résultats dans les tableaux V et VI.

TABLEAU V. — Action comparée de la fraction lipidique acétono-soluble extraite du bacille H37Rv sensible à l'INH et de sa variante résistante à 50  $\mu$ g INH par millilitre, vis-à-vis du pouvoir bactéricide de l'extrait leucocytaire acide.

Extrait acide leucocytaire obtenu de:		Effet cytologique de de l'extrait acide vis-à-vis de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>		Effet bactéricide de l'extrait acide vis-à-vis de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>		Activité ribonucléasique de l'extrait (nombre des unités ribonucléasiques par ml d'extrait)
		Coloration Gram	Coloration Giemsa	Titre bactéricide	Index d'activité	
PN du cobaye normal traités par : *	la fraction lipidique de H37Rv	Des cocci à volume réduit, agglutinés, Gram moins.	Des cocci à volume réduit, agglutinés en masses teintées en gris-rose.	45	0,18	121
	la fraction lipidique de H37Rv R. 50 INH			105	0,44	189
	Solution saline physiologique			240	1,00	266
PN du cobaye vacciné traités par : *	la fraction lipidique de H37Rv			105	0,50	174
	la fraction lipidique de H37Rv R. 50 INH			180	0,85	228
	Solution saline physiologique			210	1,00	273

\* Pour chaque volume de suspension correspondant à 100 mg d'extrait sec de leucocytes, on a ajouté 0,5 mg de la fraction lipidique expérimentée

A leur examen on constate que :

Le test morphologique ne met pas en évidence une différence appréciable entre l'action des lipides extraits des différentes souches et variantes du bacille. L'effet des enzymes provenant des leucocytes mis en contact avec les différents extraits lipidiques, s'exerce à peu près de la même manière vis-à-vis du

staphylocoque ou de *Micrococcus lysodeikticus* (tableaux V et VI). Par ailleurs, il y a une différence entre l'action des deux enzymes leucocytaires (qui, tous deux, déterminent la perte des affinités tinctoriales des microbes pour la coloration de Gram); en effet, alors que l'extrait salin (lysozymique) provoque la lyse de la cellule microbienne, l'extrait acide (ribonucléasique) détermine

TABLEAU VI. — Action comparée de la fraction lipidique acétono-soluble extraite du bacille H37Rv sensible et de sa variante résistante à 50 µg INH par millilitre, vis-à-vis du pouvoirs bactéricide de l'extrait leucocytaire salin.

Extrait acide leucocytaire obtenu de:		Effet cytologique de de l'extrait acide vis-à-vis de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> :		Effet bactéricide de l'extrait acide vis-à-vis de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>		Activité lysozymique de l'extrait salin**
		Coloration Gram	Coloration Giemsa	Titre bactéricide	Index d'activité	
PN du cobaye normal traités par: *	la fraction lipidique de H <sub>37</sub> Rv	Débris cellulaires Gram moins Très rares cocci	Débris cellulaires Très rares cocci	15	0,15	0,14
	la fraction lipidique de H <sub>37</sub> Rv R. 50 INH			45	0,50	0,31
	Solution saline physiologique			90	1,00	0,52
PN du cobaye vacciné traités par: *	la fraction lipidique de H <sub>37</sub> Rv			105	0,58	0,51
	la fraction lipidique de H <sub>37</sub> Rv R. 50 INH			150	0,83	0,67
	Solution saline physiologique			180	1,00	0,84

\* Pour chaque volume de suspension correspondant à 100 mg d'extrait sec de leucocytes on a ajouté 0,5 mg de la fraction lipidique expérimentée. \*\* Exprimée en milligrammes de glucose libéré par 100 mg de germes secs sous l'action de 1 mg d'extrait salin.

une agglutination en masse des germes, accompagnée de modifications morphologiques et tinctoriales mises en évidence par la coloration de Giemsa.

L'ensemencement sur gélose d'un mélange d'extrait leucocytaire de cobaye normal et d'émulsion microbienne est plus démonstratif (tableaux V et VI). Ainsi, la fraction lipidique acétono-soluble provenant du bacille H37Rv sensible à l'INH et virulent, diminue considérablement le pouvoir bactéricide des deux extraits enzymatiques (acide et salin), tandis que le lipide

extrait de bacille H37Rv, résistant et atténué, manifeste un effet inhibiteur plus réduit sur ce pouvoir.

Cette différence est plus évidente encore lorsqu'il s'agit des enzymes extraits des leucocytes du cobaye vacciné par le BCG, dont l'inhibition reste importante sous l'action du lipide extrait du bacille sensible et virulent, mais se trouve très réduite par les lipides extraits du bacille isoniazido-résistant atténué.

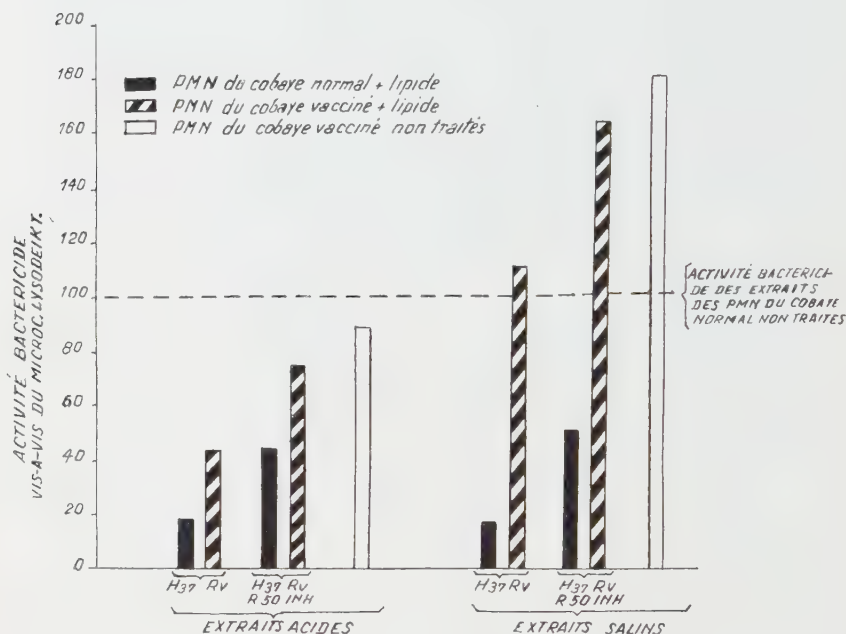


FIG. 4. — Action comparée de la fraction lipidique acétono-soluble extraite des bacilles tuberculeux sensibles et isoniazido-résistants vis-à-vis du pouvoir bactéricide des leucocytes du cobaye normal et du cobaye vacciné au BCG. L'action bactéricide des extraits des PN est rapportée à l'unité représentée par l'activité des leucocytes témoins provenant du cobaye normal.

Si nous considérons comme égal à 100 le pouvoir bactéricide des extraits de leucocytes du cobaye normal en suspension dans de l'eau physiologique, et si nous comparons ce taux bactéricide à ceux des extraits soumis à l'action des différents lipides, les différences quantitatives entre les effets inhibiteurs des deux fractions lipidiques sont encore plus évidentes (fig. 4).

En même temps, on constate une différence de comportement entre les deux extraits enzymatiques. Ainsi, le pouvoir bactéricide de l'extrait *acide* de leucocytes du cobaye vacciné subit, sous

l'influence des lipides, une diminution moindre que celle des extraits de leucocytes du cobaye normal tout en restant inférieur au pouvoir bactéricide de l'extrait de leucocytes de cobaye normal, utilisé comme témoin et non exposé à l'action des lipides. Par contre, dans les mêmes conditions de contact avec les lipides, le pouvoir bactéricide de l'extrait *salin* des leucocytes du cobaye vacciné dépasse de beaucoup le pouvoir bactéricide de l'extrait salin des leucocytes du cobaye normal témoin, et cela même lorsqu'il s'agit du lipide le plus toxique, celui du bacille H37 sensible et virulent.

Les dosages biochimiques confirment les constatations précédentes, la fraction acétono-soluble extraite de la variante isoniazido-résistante réduisant moins l'activité enzymatique des leucocytes que la même fraction extraite de la variante sensible et virulente.

Il restait encore à vérifier si les enzymes leucocytaires dont nous avons étudié l'action bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus citreus* et de *Micrococcus lysodeikticus* n'exerçaient pas une action bactéricide ou bien inhibitrice du développement du bacille tuberculeux.

#### V. ACTION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES LEUCOCYTAIRES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX [31].

Nous avons mis en contact des extraits leucocytaires (correspondant à 10 mg de leucocytes, poids sec), pendant trois heures à 37°, avec des suspensions de bacilles (correspondant à 1 mg de microbes, poids sec). Les mélanges ont été ensuite ensemencés dans un milieu liquide composé d'après Pope [32], qui permet un développement homogène, dont la marche peut être suivie par néphélométrie [32]. Des mélanges analogues ont été préparés avec les quatre souches qui ont servi à nos expériences précédentes : H37Rv sensible à l'INH et virulent, H37Rv isoniazido-résistant à 50 µg INH par millilitre, BCG sensible et BCG résistant à l'INH. Le développement des cultures est représenté par la figure 5, en fonction du temps, à l'aide du coefficient turbidimétrique de développement (C. T. D.) [voir tableau VII] calculé selon la formule :

$$\text{C. T. D.} = \frac{b - a}{a} \times 100$$

dans laquelle (a) et (b) représentent les densités optiques moyennes (moyenne des valeurs néphélométriques de tous les tubes identiquement ensemencés), déterminées au moment de l'ensemencement (a) et, ensuite, chaque jour (b) [tableau VII].



Comme il résulte du tableau VII et de la figure 5, le développement des quatre souches est totalement ou partiellement inhibé à la suite du contact avec l'extrait leucocytaire acide et salin (fig. 5).

Il y a cependant une différence entre l'action des deux extraits. Ainsi, l'extrait acide (ribonucléasique), tout en exerçant une action retardante, permet un développement des cultures, tandis que l'extrait lysozymique, non seulement empêche tout dévelop-

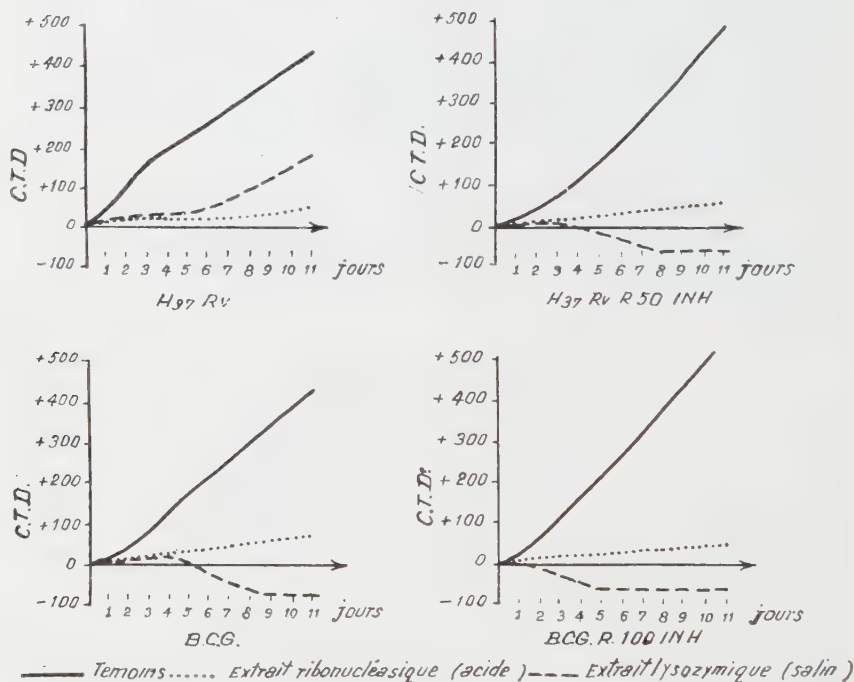


FIG. 5. — Action des extraits enzymatiques leucocytaires sur le développement du bacille tuberculeux.

pement, mais provoque même la lyse de l'inoculum initial pour certaines souches.

Ainsi, tandis que l'extrait acide exerce son action inhibitrice du développement de manière égale pour toutes les souches, l'extrait lysozymique ne l'exerce que modérément vis-à-vis de la souche H<sub>37</sub>Rv sensible et virulente, mais intensément vis-à-vis des souches atténuées (H<sub>37</sub>Rv résistant, BCG sensible et résistant) et cela non seulement en inhibant leur développement, mais en provoquant même leur lyse.

Nous tenons à ajouter que Myrvik et coll. [33, 34] ont signalé une action inhibitrice similaire du lysozyme de blanc d'œuf et de celui du sérum des tuberculeux sur le développement des bacilles tuberculeux, pathogènes et atténués (BCG). L'augmentation du taux lysozymique du leucocyte de l'animal allergique, que nos expériences mettent en évidence, pourrait fournir une explication pathogénique du fait que le sérum des tuberculeux contient la quantité appréciable de lysozyme signalée par ces auteurs.

TABLEAU VII. — Développement des bacilles de la tuberculose mis en présence des extraits enzymatiques leucocytaires (D. O. M. = densité optique moyenne ; C. T. D. = coefficient turbidimétrique de développement).

			Moment de la détermination (en jours)						
			0	1	3	5	7	9	11
H <sub>37</sub> Rv en présence de:	Contrôle	D.O.M.	20	22	52	64	80	96	108
		C.T.D.	0	10	160	220	300	380	440
	Extrait lysozymique	D.O.M.	20	22	22	26	35	47	57
		C.T.D.	0	10	10	30	75	135	185
	Extrait ribo-nucléasique	D.O.M.	20	22	22	23	26	28	29
		C.T.D.	0	10	10	15	30	40	45
H <sub>37</sub> RvR50 INH en présence de:	Contrôle	D.O.M.	20	20	36	50	71	99	112
		C.T.D.	0	0	80	150	255	395	460
	Extrait lysozymique	D.O.M.	20	20	22	16	12	6	6
		C.T.D.	0	0	10	-20	-40	-70	-70
	Extrait ribo-nucléasique	D.O.M.	20	22	22	24	26	30	32
		C.T.D.	0	10	10	20	30	50	60
BCG en présence de:	Contrôle	D.O.M.	20	21	39	49	72	91	102
		C.T.D.	0	5	95	195	260	355	410
	Extrait lysozymique	D.O.M.	20	21	24	20	14	8	6
		C.T.D.	0	5	20	0	-30	-60	-70
	Extrait ribo-nucléasique	D.O.M.	20	22	23	25	28	31	33
		C.T.D.	0	10	15	25	40	55	65
BCG R100 INH en présence de:	Contrôle	D.O.M.	20	24	46	61	78	106	126
		C.T.D.	0	20	130	205	290	430	530
	Extrait lysozymique	D.O.M.	20	20	16	10	6	6	6
		C.T.D.	0	0	-30	-50	-70	-70	-70
	Extrait ribo-nucléasique	D.O.M.	20	21	22	24	25	26	28
		C.T.D.	0	5	10	20	25	30	40

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Il résulte de nos recherches que le corps microbien intégral aussi bien que l'extrait lipidique acétone-soluble des bacilles sensibles à l'INH et virulents exercent, vis-à-vis du leucocyte polynucléaire, une action cytotoxique nettement supérieure à celle exercée par le même lipide extrait de différentes souches atté-

nuées : variante isoniazido-résistante du même bacille ou bien BCG sensible ou résistant à l'isoniazide. Il existe de ce point de vue un parallélisme étroit entre la toxicité du lipide et le degré d'atténuation.

L'action toxique du lipide acétono-soluble est différente de celle exercée par la tuberculine et son polysaccharide, qui n'agit que sur les leucocytes du cobaye en état d'allergie, tandis que le lipide acétono-soluble agit aussi bien sur le leucocyte de l'animal normal que sur celui de l'animal vacciné. Mais ce dernier est doué d'une certaine résistance vis-à-vis de la toxicité du lipide.

L'action toxique du lipide acétono-soluble se traduit par des modifications, intéressant la morphologie, la viabilité, la mobilité et le pouvoir phagocytaire des leucocytes, ainsi que par l'inhibition, partielle ou totale, des enzymes bactéricides (ribonucléase et lysozyme) extraits des leucocytes.

De ce point de vue aussi, l'action inhibitrice du lipide provenant des bacilles sensibles et virulents est supérieure à celle des lipides provenant des bacilles, atténués par acquisition de l'isoniazido-résistance ou par un autre mécanisme (BCG).

Il résulte encore de nos expériences que les leucocytes du cobaye vacciné résistent mieux à l'action toxique du lipide acétono-soluble ; en même temps leur pouvoir bactéricide, particulièrement celui du lysozyme, est notablement augmenté en comparaison de celui des leucocytes du cobaye normal.

Enfin, le fait que ces deux enzymes leucocytaires, en particulier le lysozyme, exercent leur action inhibitrice du développement et parfois bactéricide et même bactériolytique vis-à-vis du bacille tuberculeux, permet de leur attribuer un rôle, qui peut ne pas être négligeable, dans les mécanismes de défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. De ce point de vue, il est intéressant encore de noter que les variantes atténuées isoniazido-résistante et BCG sont beaucoup plus sensibles à l'action bactéricide du lysozyme que le bacille sensible et virulent, vis-à-vis duquel cet enzyme exerce une action bactériostatique, mais une action bactéricide faible.

De l'ensemble de ces résultats, nous croyons pouvoir conclure que la réduction et même l'absence de catalase et les exigences accrues en certains métabolites nécessaires à la multiplication des bacilles isoniazido-résistants ne sont pas les seuls facteurs déterminant leur atténuation. La toxicité diminuée de la fraction lipidique acétono-soluble de ces bacilles, ainsi que leur plus grande sensibilité vis-à-vis de l'action bactéricide des enzymes leucocytaires, peuvent être considérées comme des facteurs au moins tout aussi importants.

Il faut aussi tenir compte du fait que la diminution de la toxi-

cité du lipide acétono-soluble accompagne toujours l'atténuation, que celle-ci soit due à l'isoniazido-résistance ou à l'action d'autres facteurs, comme c'est le cas pour le BCG. L'absence de catalase est propre aux bacilles atténués par l'isoniazido-résistance acquise, les autres bacilles atténués (BCG, ainsi que les saprophytes acido-résistants qui, d'ailleurs, sont aussi isoniazido-résistants), étant tous catalase-positifs [4].

Enfin, il n'est pas moins significatif que ces mêmes leucocytes, lorsqu'ils proviennent d'un animal en état d'allergie, non seulement sont moins sensibles à l'action toxique des lipides acétono-solubles, mais sont en même temps doués d'un pouvoir bactéricide accru. Ainsi pourrait s'expliquer la rapide régression des lésions qui se produit à partir du moment où, chez l'animal infecté avec des bacilles isoniazido-résistants atténués, s'installe l'allergie.

L'hypothèse de l'accumulation, dans les tissus des animaux en état d'allergie, de  $H_2O_2$  que les bacilles ne pourraient plus décomposer faute de catalase [35], nous semble peu probable, étant donné l'abondance de catalase, dont tous les tissus de l'organisme sont pourvus.

Pour ce qui est du pouvoir pathogène des bacilles isoniazido-résistants pour la souris, il pourrait s'expliquer à la lumière des faits que nous venons de présenter, par le caractère particulier de la maladie tuberculeuse de cet animal. En effet, chez la souris la toxicité du bacille pour les tissus n'occupe pas le premier plan; nécrose et caséification n'apparaissent qu'une fois l'organisme envahi par des masses énormes de bacilles. Il semble donc que ce soit en premier lieu la multiplication illimitée des bacilles que rien n'entrave, qui caractérise la tuberculose de la souris. Il est donc possible que la toxicité diminuée des bacilles isoniazido-résistants pour les tissus, et en particulier pour les leucocytes polynucléaires ou les monocytes de la souris, ait moins d'importance. Du moment qu'un bacille garde intact son pouvoir de multiplication il peut, dans certaines limites, envahir l'organisme de la souris, quel que soit le degré d'affaiblissement de sa toxicité. Cela est d'autant plus plausible que la réponse immunitaire et les réactions cellulaires de défense, si rapides et intenses chez le cobaye, sont plus lentes, plus tardives et moins importantes chez la souris.

Il est vrai que l'on pourrait objecter que tous les faits sur lesquels nous basons notre raisonnement concernent les relations du bacille avec les polynucléaires, qui, comme il est bien connu, ne jouent qu'un rôle épisodique dans la défense de l'organisme contre la tuberculose, le principal rôle dans le mécanisme cellulaire étant dévolu aux macrophages.



Pour épisodique qu'il soit, et généralement limité à la phase initiale de l'infection, le rôle des polynucléaires ne peut être considéré comme insignifiant. Il semble même être particulièrement important lorsque l'agent pathogène est un bacille isoniazido-résistant. En effet, Rist et ses coll. [2 bis] signalent que, chez le cobaye, les adénopathies dues à ce type de bacilles sont le siège d'importants abcès à polynucléaires, plutôt que de nécrose caséuse.

Quant aux monocytes, nous ignorons s'ils sont, comme les polynucléaires, moins sensibles aux lipides acétono-solubles des bacilles isoniazido-résistants qu'aux lipides acétono-solubles des bacilles normaux. Selon Freerksen et Schellenberg [37], la multiplication intramonocytaire (*in vitro*) des bacilles isoniazido-résistants entraîne la mort du monocyte presque aussi rapidement que la multiplication des bacilles normaux, alors que celle des bacilles avirulents (BCG ou H37Ra) n'est pas mortelle pour le monocyte. En admettant que la souche isoniazido-résistante de ces auteurs ait les mêmes caractéristiques que la nôtre, il y aurait là une différence de comportement entre le polynucléaire et le monocyte.

En revanche, les différences que nous avons observées entre les cobayes normaux et les cobayes vaccinés semblent être valables aussi bien pour le monocyte que pour le polynucléaire. Ainsi que nous l'avons déjà souligné, de nombreux auteurs [17, 24, 30] ont signalé que les tissus des animaux infectés, ou immunisés contre la tuberculose, manifestent une intensification de leur activité enzymatique générale et l'acquisition de nouvelles propriétés enzymatiques, certaines d'entre elles particulièrement actives vis-à-vis des substances à structure lipidique. Il s'agirait donc de phénomènes intéressant toutes les cellules de l'organisme, y compris les macrophages.

Enfin, si nos recherches apportent une certaine lumière sur le mécanisme d'atténuation des bacilles isoniazido-résistants, en ce sens qu'elles mettent en évidence le rôle joué par la toxicité de l'extrait lipidique acétono-soluble, il n'en est pas moins vrai qu'elles n'augmentent pas nos connaissances concernant la fraction particulière de l'extrait à laquelle revient cette toxicité, le produit que nous avons utilisé étant encore un complexe constitué par plusieurs fractions, que nos possibilités techniques, pour le moment, ne nous ont pas permis d'isoler et d'identifier.

#### RÉSUMÉ.

Les bacilles tuberculeux isoniazido-résistants, parallèlement à une atténuation de leur pouvoir pathogène, manifestent une diminution de leur toxicité pour les polynucléaires. En même temps ces variantes sont plus sensibles que la souche d'origine.

sensible à l'INH et virulente, à l'action des enzymes leucocytaires doués d'activité bactéricide (spécialement le lysozyme).

Les souches résistantes ont ces modifications en commun avec des souches ayant subi une atténuation par d'autres mécanismes, comme le BCG.

Les recherches ont mis en évidence, en outre, chez les leucocytes de l'animal vacciné au BCG, une augmentation de résistance vis-à-vis de l'action toxique du lipide acétono-soluble extrait des bacilles tuberculeux, ainsi qu'un accroissement d'activité de leurs enzymes à action antibactérienne.

Ceci, ajouté au degré moindre de toxicité des bacilles, pourrait expliquer, entre autres, l'atténuation de leur pouvoir pathogène et surtout le caractère régressif des lésions, chez le cobaye infecté avec des bacilles isoniazido-résistants, à partir du moment de l'installation de l'allergie.

## SUMMARY

### STUDIES ON THE MECHANISM OF PATHOGENICITY ATTENUATION OF ISONIAZIDO-RESISTANT TUBERCLE BACILLUS VARIANTS.

Isoniazido-resistant t. b. show a decrease of their toxicity towards polymorphonuclears which is parallel to the decrease of their pathogenicity. At the same time, these variants are more sensitive than the original strain (which is isoniazido-sensitive and virulent) to the action of leucocytary enzymes possessing bactericidal properties (particularly lysozyme).

These modifications are common to isoniazido-resistant strains and to strains which have been attenuated by other mechanisms, such as BCG.

Besides, the experiments demonstrate in leucocytes of animals immunized with BCG, an increase of the resistance towards the toxic effect of the acetono-soluble lipid extracted from t. b. and an increase of their antibacterial enzymic activity.

These facts and the decrease of bacillary toxicity might account for the decrease of the pathogenicity and particularly the regressive character of the lesions from the moment of appearance of allergy in guinea pigs infected with isoniazido-resistant t. b.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIDDLEBROOK (G.). *Bull. Union internat. contre Tub.*, 1956, **26**, 185.
- [2] RIST (N.) et KREIS (B.). *Bull. Union internat. contre Tub.*, 1956, **26**, 214.

- [2 bis] RIST (N.), LIBERMANN (C.), GRUMBACH (F.) et LEVADITI (J.-C.). *Rev. Tub.*, 1955, **49**, 659.
- [3] FREERKSEN (E.) et MEISSNER (H.). *Bull. Union internat. contre Tub.*, 1956, **26**, 248.
- [4] NASTA (M.). *Bull. Union internat. contre Tub.*, 1956, **26**, 315.
- [5] TIRUNAYANAN (M. O.) et VISCHER (W. A.). *Am. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 62.
- [6] NASTA (M.), GEORGESCO (P.) et PAUNESCO (E.). *Cercet. de Ftiziologie (Bucarest)*, 1957, **6**, 391.
- [7] BORREL (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1893, **7**, 593.
- [8] METALNIKOV (S.) et SECRETEVA (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, **41**, 301.
- [8 bis] BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **178**, 891.
- [9] MACHEBOEUF (M.), DIERYCK (J.) et DIERYCK (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **54**, 301.
- [10] FETHKE (N.). *Substances lipoidiques du bacille tuberculeux*, Hermann, édit., Paris, 1938.
- [11] ALLGÖWER (M.) et BLOCH (H.). *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 562.
- [12] CHOUCROUN (N.), DELAUNAY (A.), BAZIN (S.) et ROBINEAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **80**, 619.
- [13] ASSELINEAU (J.). *Progr. Explor. tub.*, 1952, **5**, 1.
- [14] IONESCO-MIHAIESTI (C.), DÎMBOVICEANU (A.), OPRESCU (C. C.) et GANCEVICI (G.). *Bul. stiint. Acad. R. P. R., seria st. med.*, 1954, **6**, 245.
- [15] NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Cercet. de Ftiziologie (Bucarest)*, 1958, **7** (sous presse).
- [16] DELAUNAY (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 372.
- [17] STAHELIN (H.), SUTER (E.) et KARNOVSKY (M. L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 121 et 137 ; 1957, **105**, 265.
- [18] MACHEBOEUF (M.), DIERYCK (J.) et STOOP (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **34**, 71.
- [19] NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Ftiziologia (Bucarest)*, 1958, n° 3, 209.
- [20] MESROBEANU (I.), MESROBEANU (L.), MITRICA (N.) et PAPAZIAN (E.). *Minerva med.*, 1957, **48**, 1375.
- [21] KERBY (G. P.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **81**, 381.
- [22] NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Microbiol., Epidemiol. si Parazitol.*, 1958, n° 4 (sous presse).
- [23] O'NEILL (E. F.) et FAVOUR (C. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 577.
- [24] CANETTI (G.). *Le bacille de Koch dans la lésion tuberculeuse du poumon*, Editions méd. Flammarion, Paris, 1946.
- [25] DUBOS (R. J.). *Biochemical determinants of microbiological diseases*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1954.
- [26] GROGG (E.) et PEARSE (A. G. E.). *Brit. J. exp. Path.*, 1952, **33**, 567.
- [27] GERSTL (B.), TENNANT (R.) et PELZMAN (O.). *Yale J. Biol.*, 1944-1945, **47**, 455.
- [28] HAMALAINEN (R.). *Acta Soc. Med. « Duodecim », Series A.*, 1947, **23**, 97.

- [29] MARTIN (S. P.), CHAUDHURI (S. N.), COOPER (C. D.) et GREEN (R.). *Experimental Tuberculosis, Ciba Symposium*, J. et A. Churchill, édit., Londres, 1955, p. 102.
  - [30] VOGEL (F. S.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 305.
  - [31] PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Ftiziologia (Bucarest)*, 1958, n° 2, 141.
  - [32] POPE (H.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **73**, 735.
  - [33] MYRVIK (Q. N.) et WEISER (R. S.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **64**, 669.
  - [34] MYRVIK (Q. N.), WEISER (R. D.) et AGAR (H. D.). *Am. Rev. Tub.*, 1958, **68**, 212.
  - [35] COLEMAN (C. M.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 42.
  - [36] HALLAUER (C.). *Zbl. Bakt.*, 1929, **114**, 519.
  - [37] FREERKSEN (E.) et SCHELLENBERG (H.). *Z. Hyg.*, 1956, **142**, 554.
-

# CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE

## I. — ESSAIS DE CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE SUR CULTURE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES DE REIN DE LAPIN

par P. SUREAU, A. DODIN et E. R. BRYGOO (\*).

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : J. COURDURIER])

Dans le cadre des recommandations du Séminaire sur la vaccination antivariolique organisé par l'O. M. S. à Lima en août 1956 [1, 2] et en particulier dans le but d'obtenir un vaccin antivariolique exempt de germes et facile à dessécher sous vide après congélation, nous avons entrepris la culture du virus vaccinal en culture de tissus.

De nombreux auteurs ont déjà réalisé cette culture, soit sur cellules cancéreuses d'origine humaine [3, 4, 5], soit sur cellules d'origine animale [6, 7, 8]. Wesslen [9] prépare et utilise en Suède un vaccin antivariolique obtenu sur fragments de peau d'embryon bovin. Vieuchange et coll. [10] ont étudié l'action cytopathogène du virus vaccinal sur explants de rein de lapin.

Nous avons utilisé pour nos essais des cultures de cellules épithéliales de rein de lapin en couche monocellulaire.

### I. — CULTURE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES DE REIN DE LAPIN EN COUCHE MONOCELLULAIRE.

Les reins sont prélevés sur de jeunes adultes. La corticale est soumise à une digestion par la trypsine à la température de 37°, selon la technique de Dulbecco et Vogt [11] modifiée par Youngner [12]. Le culot cellulaire obtenu est mis en suspension dans le milieu à l'hydrolysate de caséine décrit par Lépine, Slizewicz, Daniel et Paccaud [13, 14], additionné de 10 p. 100 de sérum de veau et d'antibiotiques.

Les cultures sont faites en tubes pyrex de 18 x 180 (2 ml de suspension cellulaire par tube) et en boîtes de Jouan pyrex de 1 000 ml (100 ml de suspension par boîte).

A partir du rein de lapin, la couche cellulaire obtenue (explant primaire) est complète après huit jours et les cellules utilisables pour l'inoculation du virus (fig. 1).

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mai 1958.



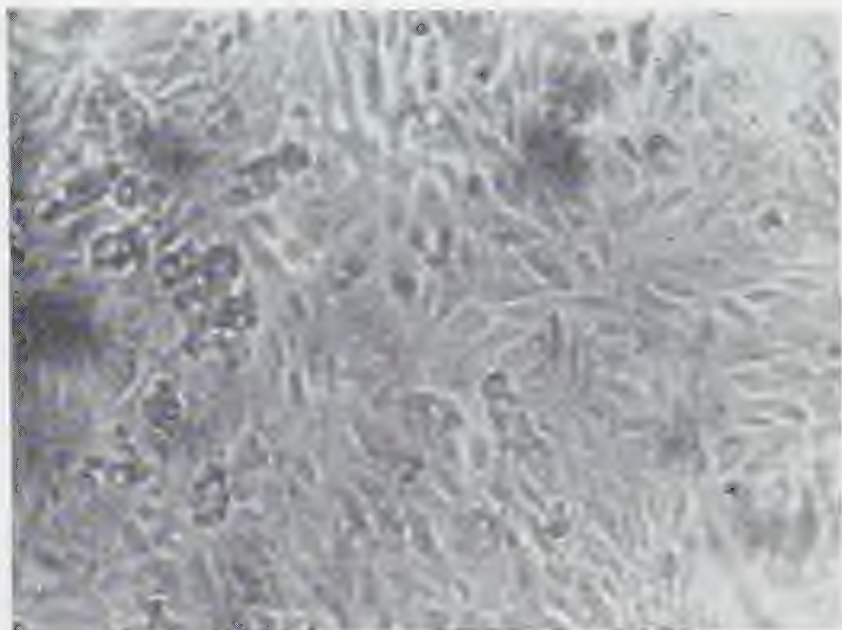


FIG. 1. — Explant primaire.

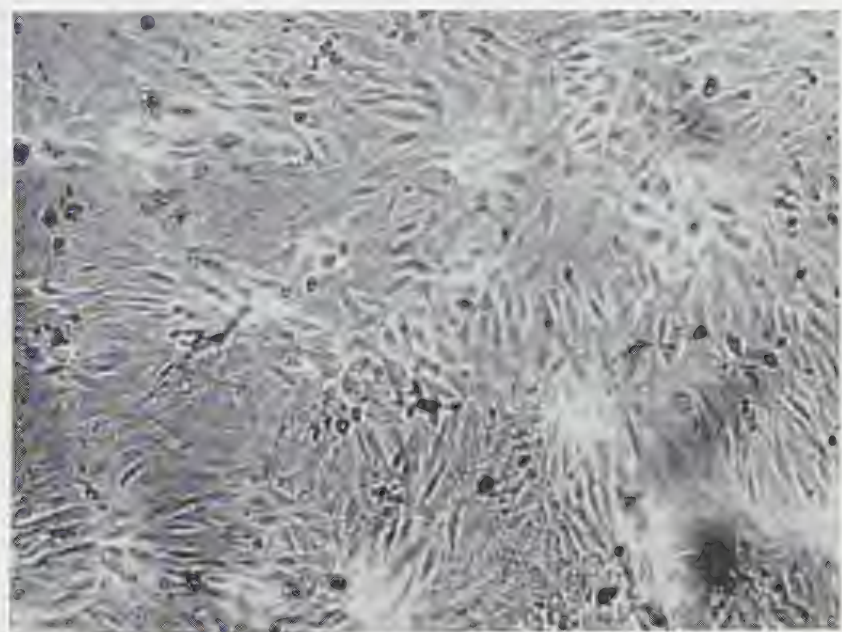


FIG. 2. — Explant secondaire.

A partir des boîtes de Jouan d'explant primaire, nous obtenons par trypsination des « cultures-filles » (explant secondaire) qui, en tubes ou en boîtes, donnent à ce premier passage une couche cellulaire complète, prête pour l'inoculation après deux à trois jours (fig. 2).

## II. — CULTURE DU VIRUS VACCINAL SUR CELLULES DE REIN DE LAPIN.

a) *Origine du virus.* — Nous avons utilisé comme source de virus vaccinal le vaccin antivariolique glycérimé de l'Institut Pasteur de Madagascar (pulpe vaccinale récoltée sur génisse et conservée congelée glycerinée à  $-30^{\circ}$ ). Pour obtenir un virus exempt de germes et pour l'adapter aux tissus du lapin, nous avons inoculé cette lymphé vaccinale au lapin par voie intratesticulaire. Le testicule, prélevé quatre jours après l'inoculation, a été broyé et dilué au 1/5 en solution saline tamponnée additionnée d'antibiotiques. La suspension obtenue (Testi-Vaccine), conservée en ampoules scellées à  $-30^{\circ}$ , a servi à l'inoculation des cultures de tissu rénal de lapin.

b) *Technique d'inoculation des cultures de tissu.* — Le milieu de culture des tubes est enlevé par aspiration ; la suspension virulente (virus pur ou dilutions) est inoculée à raison de 0,2 ml par tube ; le virus est laissé en contact avec les cellules pendant trente minutes à la température du laboratoire ; on ajoute ensuite à chaque tube 1,8 ml de milieu de culture. L'inoculum subit ainsi lors de l'inoculation une dilution de  $10^{-1}$ . Les tubes sont remis à incuber à l'étuve à  $37^{\circ}$  en position inclinée fixe et examinés chaque jour en même temps que les témoins non inoculés de la même série.

Pour les boîtes de Jouan, le volume de l'inoculum est de 10 ml ; on ajoute ensuite 90 ml de milieu de culture.

c) *Premier passage du virus vaccinal sur culture de tissu rénal de lapin.* — Vingt-quatre heures après l'inoculation de la testivaccine on observe, parmi les cellules saines de la couche cellulaire, quelques cellules arrondies réfringentes (notation +) ; après quarante-huit heures, se produit une rétraction de la couche cellulaire avec apparition de plages claires bordées d'îlots de cellules réfringentes granuleuses (notation ++ ) ; le troisième jour la couche cellulaire est dissociée et on voit de gros amas de cellules granuleuses en voie de lyse (notation +++ ) ; enfin, le quatrième jour, lyse totale, les cellules sont décollées de la paroi des tubes (notation ++++ ). Le liquide des tubes est récolté le quatrième jour et conservé congelé à  $-30^{\circ}$ .

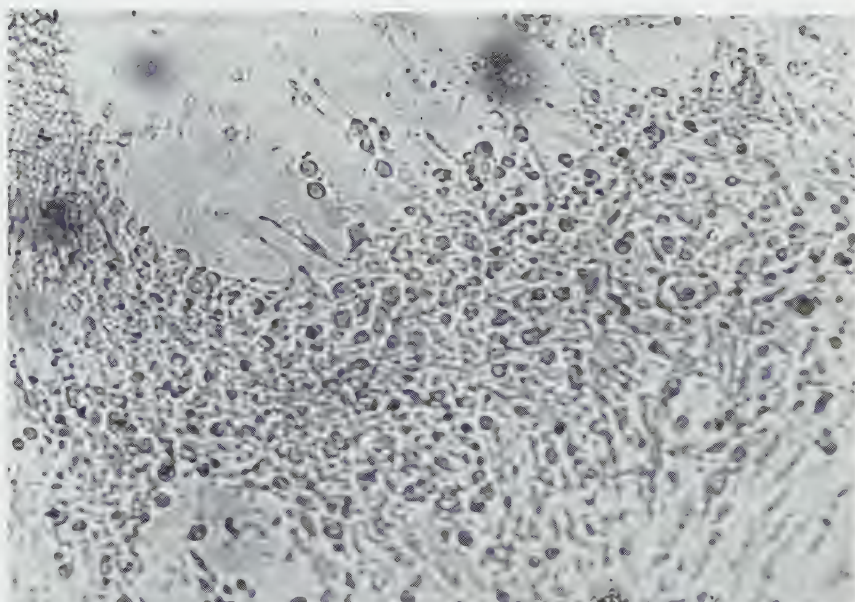


FIG. 3. — Lésions ++.

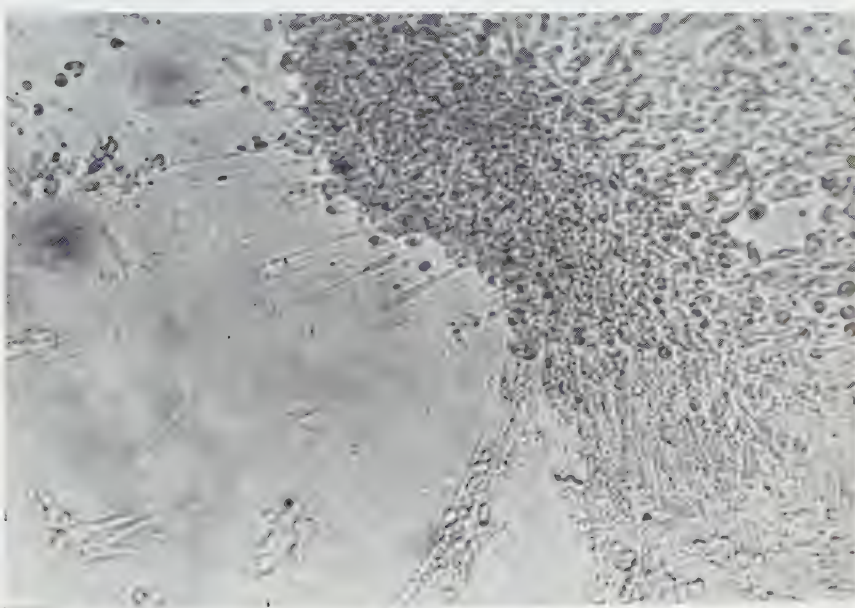


FIG. 4. — Lésions +++.



d) *Passages en série du virus vaccinal sur culture de tissu rénal de lapin.* — Des passages en série furent réalisés avec la même technique d'inoculation. Des titrages sur cultures de tissus ont été effectués en diluant l'inoculum dans du milieu de culture sans sérum de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  et en inoculant 0,2 ml de chaque dilution dans 2 à 5 tubes. Parallèlement, ont été faits des titrages sur lapin par inoculation intradermique de 0,2 ml de chaque dilution ; la dilution donnant encore une induration érythéma-

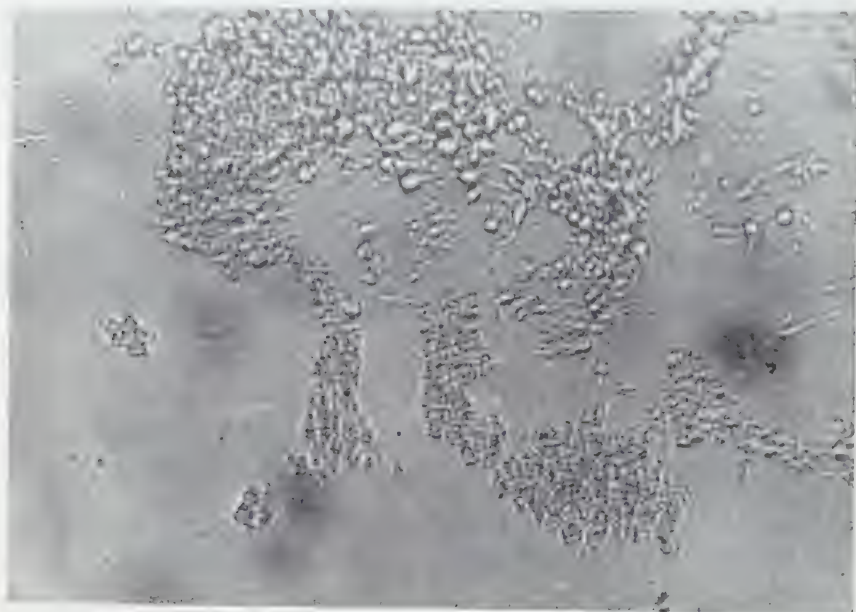


FIG. 5. — Lésions + + + +.

teuse nettement palpable de 8 à 10 mm de diamètre a été considérée comme dilution limite.

Lors des passages en série, les lésions cellulaires, avec le liquide virulent non dilué, atteignent souvent ++ après vingt-quatre heures et + + + + le deuxième jour.

Lors des titrages, les lésions cellulaires sont d'autant plus précoces que la concentration de l'inoculum est plus forte. Il s'écoule en moyenne trois jours entre le début de l'effet cytopathogène (+) et la lyse totale (+ + + +) [fig. 3, 4 et 5].

Les résultats des passages en série et des titrages correspondants sont exposés dans le tableau I.

Le virus vaccinal se multiplie sur les cultures de cellules rénales.

TABLEAU I. — Culture du virus vaccinal sur cellules de rein de lapin.

Inoculum	Logarithme de dilution après inoculation	Nombre de jours de culture		Produit récolté		
		du passage	Total	VV/CRL N° du passage	Titre sur culture tissu	par i.D.R. au lapin
Testi-Vaccine					$\geq 10^{-5}$	$10^{-6}$
Testi-Vaccine	$10^{-1}$	4	4	I	$\geq 10^{-5}$	
VV/CRL* I	$10^{-2}$	2	6	II	$\geq 10^{-6}$	
— II	$10^{-3}$	2	8	III	$\geq 10^{-6}$	$10^{-7}$
— III	$10^{-4}$	3	11	IV	$\geq 10^{-6}$	
— IV	$10^{-5}$	3	14	V		$10^{-7}$
— V	$10^{-6}$	3	17	VI		
— VI	$10^{-7}$	4	21	VII	$\geq 10^{-6}$	
— VII	$10^{-8}$	2	23	VIII		

\* VV/CRL = Virus vaccinal sur cellules de rein de lapin.

TABLEAU II. — Passages en série du virus vaccinal sur culture de rein de lapin.

Inoculum		Logarithme de dilution		Nombre de jours de culture		Produit récolté	
		de l'inoculum	après inoculation	du passage	Total	VV/CRL N° du passage	Titre sur culture tissu.
1 <sup>re</sup> SÉRIE	Testi-Vaccine	$10^{-2}$	$10^{-3}$	6	6	I	$\geq 10^{-5}$
	VV/CRL* I	$10^{-2}$	$10^{-6}$	3	9	II	
	— II	$10^{-2}$	$10^{-9}$	3	12	III	
	— III	$10^{-2}$	$10^{-12}$	4	16	IV	
	— IV	$10^{-2}$	$10^{-15}$	3	19	V	$\geq 10^{-6}$
	— V	$10^{-2}$	$10^{-18}$	3	22	VI	
2 <sup>me</sup> SÉRIE	Testi-Vaccine	$10^{-4}$	$10^{-5}$	8	8	I	$\geq 10^{-5}$
	VV/CRL I	$10^{-4}$	$10^{-10}$	6	14	II	$\geq 10^{-5}$
	— II	$10^{-4}$	$10^{-15}$	6	20	III	
	— III	$10^{-4}$	$10^{-20}$	4	24	IV	$\geq 10^{-6}$
	— IV	$10^{-4}$	$10^{-25}$	6	30	V	

\* VV/CRL = Virus vaccinal sur culture de rein de lapin.



de lapin. Le titre des liquides virulents récoltés est toujours au moins de  $10^{-6}$  en cultures de tissus, et sur lapin le titre a varié de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$ .

e) *Vérification de la multiplication du virus vaccinal en cultures de tissu rénal de lapin.* — Dans le but de vérifier si le virus se multipliait réellement au cours des passages sur tissu rénal de lapin, nous avons fait deux séries de passages au cours desquels l'inoculum était dilué, à chaque passage, dans la première série à  $10^{-2}$  et dans la deuxième série à  $10^{-4}$ .

Les résultats de ces passages en série et des titrages correspondants sont exposés dans le tableau II.

Lors de ces passages en série le virus subit des dilutions importantes par rapport à l'inoculum initial ( $10^{-18}$  dans la première série et  $10^{-25}$  dans la seconde). Le titre sur culture de tissus s'est maintenu au moins égal à  $10^{-6}$ .

La multiplication du virus vaccinal sur culture de cellules épithéliales de rein de lapin a donc été obtenue, au cours de ces passages, sans baisse du titre du virus.

#### CONCLUSIONS.

La multiplication du virus vaccinal a été obtenue *in vitro* sur cellules épithéliales de rein de lapin cultivées en couche monocellulaire. Cette multiplication s'accompagne d'un effet cytopathogène à l'égard de ces cellules. Les passages successifs sur cellules *in vitro* n'ont pas modifié ce pouvoir cytopathogène et ont permis de maintenir le taux de virulence du virus.

Nous étudions actuellement les effets du stockage à différentes températures (en particulier,  $37^{\circ}$  et  $45^{\circ}$ ) sur ce virus desséché sous vide après congélation.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs ont cultivé le virus vaccinal sur cellules épithéliales de rein de lapin cultivées en couche monocellulaire dans un milieu à l'hydrolysate de caséine.

#### SUMMARY

##### CULTURE OF VACCINIA VIRUS.

##### I. — ATTEMPTS TO CULTURE VACCINIA VIRUS ON TISSUE CULTURE OF RABBIT KIDNEY EPITHELIAL CELLS.

The authors have been able to realize the multiplication of this virus on monolayers cultures of rabbit kidney epithelial cells, in a medium containing casein hydrolysate.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 1957, **42**, 109-172.
  - [2] *Chron. O. M. S.*, 1958, **42**, 3-7.
  - [3] LAVILLAUREIX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 735-741.
  - [4] RYDEN (F. W.) et RANDALL (Ch. C.). *Am. J. Path.*, 1957, **33**, 367-383.
  - [5] SCHERER (W. F.) et SYVERTON (J. T.). *Amer. J. Path.*, 1954, **30**, 1057-1073.
  - [6] SCHWOEBEL (W.) et MAYR (A.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1956, **167**, 178-200.
  - [7] RAMON (G.) et coll. *Rev. Immunol.*, 1954, **48**, 1-20.
  - [8] HAFF (R. F.) et SWIM (H. E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 200-204.
  - [9] WESSLEN (T.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1956, **6**, 430-438.
  - [10] VIEUCHANGE et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 218-224.
  - [11] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 167.
  - [12] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
  - [13] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (Ph.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654-656.
  - [14] LÉPINE (P.), DANIEL (Ph.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 567-575.
-

# LA RAGE EN AFRIQUE ÉQUATORIALE FRANÇAISE

## AU COURS DES CINQ DERNIÈRES ANNÉES

### I. — ACTIVITÉS DE L'INSTITUT PASTEUR DE BRAZZAVILLE POUR LE DÉPISTAGE DE LA RAGE

par R. DEPOUX, J. ORIO, P. MERVEILLE et J. CECCALDI (\*).

*(Institut Pasteur de Brazzaville)*

La rage sévit à l'état endémique en Afrique Equatoriale Française et constitue toujours un problème sérieux, non seulement de police sanitaire, mais aussi de prévention de la maladie humaine après morsure.

Du point de vue prophylactique, aucune campagne de vaccination systématique des chiens ne fut jamais tentée sur le territoire de la Fédération. Certes, quelques animaux domestiques sont bien vaccinés dans les agglomérations, mais leur nombre reste faible ; encore les vaccinations ne sont-elles pas toujours faites avec la régularité souhaitable.

D'autre part, le nombre de chiens errants est considérable dans les innombrables villages africains, et aucun service correct de ramassage systématique ne peut être actuellement mis sur pied, faute de crédits.

La contribution de l'Institut Pasteur de Brazzaville à la lutte contre la rage est de trois ordres :

1° Il assure la fabrication d'un vaccin antirabique phéniqué, type Fermi, utilisé pour toutes les vaccinations humaines et pour une partie des vaccinations animales.

2° Une consultation spéciale y assure le traitement des personnes mordues dans la région de Brazzaville, et le contrôle sur fiches des traitements humains institués par les médecins dans le reste de la Fédération.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mai 1958.

3° Enfin, les cerveaux suspects sont adressés à l'Institut à fin de diagnostic de rage, des territoires du Gabon, du Moyen-Congo, de l'Oubangui-Chari et même parfois du Tchad.

Le Laboratoire vétérinaire de Farcha (Fort-Lamy) complète l'activité de l'Institut Pasteur en assurant la plus grande partie des diagnostics de rage sur les cerveaux suspects provenant du Tchad, et en produisant de très importantes quantités de vaccin formolé à usage vétérinaire.

Le présent travail a pour but de faire le bilan de notre activité dans cette lutte contre la rage pendant la période allant de janvier 1953 à juillet 1957.

Nous tenons à remercier MM. les D<sup>rs</sup> vétérinaires Baradat, inspecteur général de l'Élevage ; Thome, directeur du Laboratoire de Farcha, et Cassard, pour l'aide qu'ils ont bien voulu nous apporter en nous communiquant les chiffres relatifs à l'activité du Laboratoire de Farcha. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

#### MÉTHODES UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC DE LA RAGE.

Les cerveaux suspects nous parviennent le plus souvent, partie en glycérine, partie dans la solution à 10 p. 100 du formol commercial. Il nous est donc possible de pratiquer des examens anatomo-pathologiques et des inoculations aux animaux de laboratoire.

#### EXAMENS ANATOMO-PATHOLOGIQUES.

La région de la circonvolution de l'hippocampe est séparée en deux. La première partie fait l'objet d'une inclusion rapide en paraffine sous forme de très fines lamelles qui, après section au microtome, sont colorées par la méthode de Lépine [1]. La lecture peut être faite au bout de quarante-huit heures. L'autre partie suit un cycle normal d'inclusion en paraffine. Les colorations utilisées sont, outre une hémateïne-érythrosine de routine, celles permettant de mettre en évidence les corps de Negri (Lépine, Mann et Mallory). Les résultats de ces trois colorations sont remarquablement concordants, tout en présentant cependant chacune des particularités intéressantes. La méthode de Mann est la méthode de base, de référence, mais les corps de Negri peuvent être difficiles à voir si le cerveau n'est pas dans un état de conservation parfait ; ils apparaissent alors plus facilement après coloration par l'hématoxyline phospho-tungstique de Mallory. La méthode de Lépine a le très grand avantage de sa rapidité ; elle est malheureusement inutilisable si le cerveau est quelque peu altéré, ce qui est encore trop fréquent.

## INOCULATIONS.

Les fragments de cerveaux parvenus en glycérine sont broyés au mortier pour faire une suspension en eau physiologique à 15 p. 100 environ de matière cérébrale. Cette suspension est injectée par voie intracérébrale : systématiquement à 10 souris et éventuellement à 2 cobayes, un lapin ou un singe.

Dès l'apparition des paralysies, les animaux sont sacrifiés et les cerveaux prélevés pour examen anatomo-pathologique. En l'absence de paralysies, une souris est sacrifiée le dixième jour et une autre le vingtième jour.

Une autre méthode d'investigation fut essayée, la réaction de déviation du complément utilisant le cerveau de l'animal suspect comme antigène. Cette technique aurait été pratiquée avec succès par certains auteurs [2, 3, 4]. Malheureusement, cette réaction ne nous a pas donné de résultats suffisamment fidèles pour justifier son emploi systématique [5, 6, 7], malgré la rapidité d'exécution qui constituerait son intérêt majeur.

Enfin les corps de Negri furent aussi éventuellement recherchés sur les empreintes sur lames colorées par la méthode de Sellers.

## RÉSULTATS.

Du 1<sup>er</sup> janvier 1953 au 1<sup>er</sup> juillet 1957, 364 cerveaux animaux ou humains suspects ont été examinés et 131 ont été reconnus infectés par le virus rabique, soit 35,9 p. 100. Pour chaque année, les pourcentages sont respectivement : 28,8 p. 100 en 1953, 44,8 p. 100 en 1954, 25,2 p. 100 en 1955, 40 p. 100 en 1956 et 42,5 p. 100 pendant le premier semestre 1957 [8, 9, 10, 11, 12].

TABLEAU I.

	1953		1954		1955		1956		1957 1 <sup>er</sup> sem.		TOTAL	
	S	+	S	+	S	+	S	+	S	+	S	+
Chiens	36	12	44	24	51	15	66	31	21	15	218	97
Chats	14	1	26	6	25	5	19	4	13	0	97	16
Hommes	4	4	2	2	2	2	3	2	2	2	13	12
Divers	5	0	6	3	9	0	12	3	4	0	36	6
TOTAL	59	17	78	35	87	22	100	40	40	17	364	131

S, cerveaux suspects de rage ; +, cerveau reconnu infecté par le virus rabique.

Les animaux classés sous la rubrique « Divers » sont des singes, rats, moutons, antilopes, chacals, genettes, etc.



Le chien arrive largement en tête des animaux susceptibles de transmettre la rage à l'homme, et ce, tant en pourcentage qu'en valeur absolue.

Indépendamment de ces examens destinés à faire un diagnostic sur un cerveau suspect, des recherches systématiques de rage ont été entreprises sur des rats pris au piège (*Rattus rattus*, *Rattus [Mastomys] coucha*, *Lemniscomys striatus striatus*), ou sur des chauves-souris frugivores (*Eidolon helvum*). Dans ce cas, les cerveaux ne sont pas examinés un à un, mais broyés par lots de 3 à 5 et l'émulsion ainsi obtenue est injectée par voie intracérébrale à un lot de 6 souris.

Nous n'avons pas pu, ainsi, mettre en évidence de rage, ni chez les rats, ni chez les chauves-souris.

#### DISCUSSION.

La rage est un problème sérieux en A. E. F., d'autant plus que les chiffres cités ci-dessus ne représentent certainement pas la réalité. En effet, la plupart des chiens qui meurent dans les villages de brousse et même, sans doute, en ville ne font pas l'objet d'examen. Il est aussi très probable que les cas humains sont plus nombreux que ceux figurant dans le tableau. Il est intéressant de noter que malgré leur grande abondance, ni les chauves-souris, ni les rats ne semblent jouer de rôle dans la transmission de la rage à l'homme.

En pratique, le diagnostic de rage chez l'animal suspect n'est pas toujours aisé, car, malheureusement, trop souvent encore les prélèvements des cerveaux sont faits dans de mauvaises conditions : malgré la diffusion de notes techniques [13] par la Direction de la Santé publique, il nous arrive de recevoir des cerveaux uniquement en glycérine (donc pas d'histologie possible) ou, plus souvent, uniquement en formol (donc pas d'inoculations possibles). D'autre part, le prélèvement trop tardif après la mort est sans doute la raison pour laquelle des cerveaux arrivent à l'Institut Pasteur partiellement putréfiés, rendant toute histologie impossible.

Enfin, le diagnostic différentiel entre rage et maladie de Carré est le plus souvent très délicat par les simples examens anatomo-pathologiques. La très grande fréquence de cette dernière affection en A. E. F. explique que dans un nombre non négligeable de cas (environ 6 p. 100), les souris survivent à l'inoculation de l'émulsion d'un cerveau, présentant des inclusions type Negri dans le cytoplasme des cellules de la corne d'Ammon.

## II. — ACTIVITÉS DE L'INSTITUT PASTEUR DE BRAZZAVILLE DANS LA PRÉVENTION ET LE TRAITEMENT DE LA RAGE HUMAINE

par J. ORIO, R. DEPOUX, P. MERVEILLE et J. CECCALDI.

### A. — PRÉPARATION DU VACCIN ANTIRABIQUE.

I. *Technique, contrôles* : Le vaccin antirabique de l'Institut Pasteur de Brazzaville est un vaccin phéniqué, type Fermi, préparé selon la méthode de l'Institut Pasteur de Paris, recommandée par les experts de l'O. M. S. [14].

Il est constitué d'une suspension à 5 p. 100 de matière cérébrale de moutons et de cabris inoculés de virus rabique fixe, dans de l'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100.

La souche de virus employée est la souche Louis-Pasteur, qui était, le 30 juin 1957, à son quatre cent soixantième passage brazzavillois.

Le vaccin est régulièrement contrôlé du point de vue stérilité, efficacité, teneur en phénol. Les tests de Habel pratiqués ont toujours donné un indice de protection supérieur à 3, donc largement conforme aux normes de l'O. M. S. (standard minimum : log. 3).

II. *Quantités préparées de janvier 1953 à juillet 1957* (voir tableau II).

TABLEAU II.

	1953	1954	1955	1956	1 <sup>er</sup> sem. 1957
Vaccin humain	62.820	67.045	70.905	95.095	44.650
Vaccin vétérinaire	45.190	59.725	65.510	57.810	33.940
TOTAL	108.010	126.770	136.415	152.905	78.590

### B. — RÉPARTITION DU VACCIN A USAGE HUMAIN DANS LA FÉDÉRATION.

Du 1<sup>er</sup> janvier 1953 au 1<sup>er</sup> juillet 1957, il a été préparé une moyenne annuelle de 71 400 ml de vaccin antirabique avec progression constante de 62 820 ml en 1953 à 42 472 pour le seul premier semestre 1957.

Au Moyen-Congo, la moyenne de distribution annuelle a été

de 9 200 ml pour Brazzaville, 5 200 ml pour Pointe-Noire, 2 600 pour Dolisie et 350 ml pour les autres localités ;

Au Gabon, Libreville a reçu en moyenne, annuellement, 3 800 ml, Port-Gentil 760 ml et les autres localités se sont partagé 1 400 ml ;

En Oubangui-Chari, Bangui a demandé 21 000 ml par an ;

Enfin, au Tchad, il a été expédié en moyenne 24 000 ml par an à Fort-Lamy et 4 500 ml à Fort-Archambault.

### C. — TRAITEMENTS ANTIRABIKES.

I. Nombre de personnes traitées à l'Institut Pasteur de Brazzaville (voir tableau III).

TABLEAU III.

ANNÉES :		1953	1954	1955	1956	1957/1
Nombre de personnes ayant reçu un traitement antirabique.	Européens	105	104	107	69	33
	Africains	229	362	315	358	194
	Total	334	466	422	427	227
Morts survenues pendant le traitement ou moins de 15 jours après le traitement antirabique.	Européens	0	0	0	0	0
	Africains	2	1	1	3	1
Morts survenues plus de 15 jours après la fin du traitement.	Nombre	Européens	—	—	—	—
		Africains	—	—	—	—
	%	Européens	0	0	0	0
		Africains	0	0	0	0

II. Nombre de personnes traitées en A. E. F.

Cette statistique est fatalement incomplète, de trop nombreux centres de la Fédération omettant de nous renvoyer les fiches de renseignements jointes aux traitements antirabiques qui leur sont expédiés (tableau IV).

III. *Traitements par le sérum antirabique* : a) Dans des cas de morsures bénignes par chien connu, mis en observation, le sérum antirabique a été utilisé exclusivement.

Cinq mordus ont été ainsi traités en 1955, 13 en 1956 et 10 en 1957 (premier semestre).

b) Le traitement mixte, sérum et vaccin antirabiques, a été appliqué à 7 mordus en 1955, 21 en 1956 et 3 en 1957 (premier semestre).

TABLEAU IV.

Années	Européens	Africains	Total	Répartition
1953	126	199	325	Tchad 198 Moyen Congo 81 Oubangui Chari 42 Gabon 4
1954	105	196	301	Tchad 123 Moyen Congo 162 Oubangui Chari 11 Gabon 5
1955	87	138	225	Tchad 113 Moyen Congo 85 Oubangui Chari 25 Gabon 2
1956	215	390	605	Tchad 201 Moyen Congo 189 Oubangui Chari 163 Gabon 52
1957 1 <sup>er</sup> sem.	70	203	273	Tchad 110 Moyen Congo 58 Oubangui Chari 99 Gabon 11

## D. — LA RAGE HUMAINE EN A. E. F.

Du 1<sup>er</sup> janvier 1953 au 31 juillet 1957, la rage a, à notre connaissance, tué 15 personnes dans l'ensemble de la Fédération.

Ces cas sont les suivants :

1953.

OBSERVATION I. — Fort-Archambault (Tchad). Pang..., Africain de 8 ans. Morsures profondes de la tête par chien le 1<sup>er</sup> juillet. Injection quotidienne de vaccin antirabique phéniqué (5 ml) du 1<sup>er</sup> au 16 juillet. L'enfant disparaît après la seizième injection et rentre à l'hôpital de Fort-Archambault le 21 juillet. Il y meurt de rage le lendemain, vingt jours après les morsures.

OBS. II. — Bouar (Oubangui-Chari). M. Bess..., vétérinaire européen, entre à l'hôpital de Bouar le 5 août et y meurt de rage le lendemain. L'origine et la date de la contamination sont inconnues. L'intéressé aurait eu à examiner, deux mois auparavant, une lionne apprivoisée devenue furieuse, et n'aurait pas subi de traitement antirabique.

OBS. III. — Brazzaville. Mon... Mav..., Africain de 40 ans, entre à l'hôpital général de Brazzaville le 14 septembre et y meurt de rage le lendemain.

L'origine et la date de la contamination sont inconnues.

Pas de traitement.

OBS. IV. — Kinkala (Moyen-Congo). N'Dé..., Africaine de 12 ans. Morsure profonde du mollet droit par chien le 10 novembre. Début du traitement le 18 novembre, huit jours après la morsure, à raison

de deux injections de 5 ml par jour pendant dix jours puis d'une seule les dix jours suivants. Le 20 décembre, douze jours après la fin du traitement et quarante jours après la morsure, la fillette entre à l'hôpital général de Brazzaville et meurt de rage. Le virus, isolé du cerveau de la malade, ne se montra par particulièrement agressif chez les animaux inoculés. Chez eux l'incubation de la maladie fut de dix-sept jours en moyenne. Le retard apporté à la vaccination permet de considérer cette observation comme un faux échec au traitement.

1954.

OBS. V. — Brazzaville. Male..., Africaine de 36 ans. Morsures superficielles de la main et de l'avant-bras gauche par chien le 9 juillet. Le traitement commence le 28 juillet, dix-neuf jours après la morsure et comporte trois injections quotidiennes de 5 ml pendant cinq jours, puis deux pendant cinq jours et enfin une seule pendant dix jours, soit 175 ml de vaccin antirabique.

Cette femme entre à l'hôpital général de Brazzaville le 25 août et y meurt de rage le lendemain, quarante-sept jours après la morsure. Cette observation, étant donné la date tardive de mise en traitement, peut, elle aussi, être considérée comme un faux échec.

OBS. VI. — Bouar (Oubangui-Chari). Daï..., Africain de 36 ans. Morsures superficielles de l'avant-bras gauche par chien le 19 octobre. Refuse le traitement.

Entre à l'hôpital de Bouar le 2 décembre et meurt de rage le 6, quarante-huit jours après les morsures.

1955.

OBS. VII. — Bediondo (Tchad). M. T..., Africain de 55 ans. Morsures superficielles du pied droit par chien errant le 2 janvier. Début du traitement le 16 mars, soixante-quatorze jours après la morsure. Injection quotidienne de 5 ml de vaccin antirabique pendant vingt et un jours. Le 13 avril, sept jours après la fin du traitement, l'intéressé est hospitalisé à Fort-Lamy et meurt de rage le lendemain, cent trois jours après la contamination.

OBS. VIII. — Bocaranga (Oubangui-Chari). Y..., Africain de 20 ans. Morsure de la main droite par chien errant le 26 juin. Pas de traitement. Décès par rage le 25 juillet, trente et un jours après la morsure.

1956.

OBS. IX. — Pala (Tchad). Nadj..., Africain de 5 ans. Morsure de la joue, de la région malaire et de la commissure labiale droite, par chien errant, le 28 août. Le traitement est commencé le 30 août, deux jours après les morsures et est poursuivi à raison d'une injection quotidienne de 5 ml jusqu'au 11 septembre, date du décès par rage clinique, quatorze jours après les morsures. Leur multiplicité et leur siège suffisent peut-être à expliquer la brièveté de l'incubation sans qu'il soit nécessaire d'invoquer l'action d'un virus dit « renforcé », que l'absence de prélèvements n'a pas permis d'étudier.



OBS. X. — Léré (Tchad). Pat..., Africain de 10 ans. Morsures profondes du bras gauche le 6 juin par un chien « fou ». Début du traitement le 12 juin, à raison d'une injection quotidienne de 5 ml de vaccin. L'enfant interrompt le traitement à la quinzième injection et meurt de rage clinique le 7 juillet, trente et un jours après la morsure.

OBS. XI. — Moundou (Tchad). Da..., Africaine de 25 ans. Morsure de la main droite par chien errant le 26 septembre. Début du traitement le 24 novembre, cinquante-huit jours après la morsure, alors que la rage est déclarée.

La malade reçoit 18 ml de vaccin et décède dans la soirée. Le médecin étant en tournée, aucun prélèvement n'a été pratiqué. Rage clinique.

OBS. XII. — Pointe-Noire (Moyen-Congo). Isson..., Africaine de 25 ans. Morsure profonde de la face par chien errant le 21 août. Pas de traitement.

Décès par rage le 26 octobre, soixante-six jours après la morsure.

OBS. XIII. — Pointe-Noire. Bru..., Africain de 4 ans. Contact avec des chiens errants sans que la date puisse être précisée. Décès par rage le 8 décembre.

1957.

OBS. XIV. — Pointe-Noire. Moun..., Africain de 27 ans. Morsure profonde de l'avant-bras droit par chien errant le 7 décembre 1956. Aucun traitement. Décès par rage le 7 janvier 1957, trente et un jours après la morsure.

OBS. XV. — Am Gamouina (Tchad). Hardj..., Africaine de 50 ans. Morsure de l'aile droite du nez par chien inconnu, vers le 20 janvier. Hospitalisation à Abéché le 2 mars. Traitement par deux injections de 5 ml de vaccin antirabique jusqu'au 5 mars, date du décès par rage, quarante-quatre jours après la morsure.

#### DISCUSSION.

L'examen des chiffres et des observations qui précèdent montre que la rage représente une des préoccupations majeures du médecin épidémiologiste en A. E. F.

Le nombre de cas humains observés est certainement loin de correspondre à la réalité.

Trop souvent, les sujets mordus négligent de se faire examiner et traiter.

Sur 15 individus décédés après morsure, 7 n'ont suivi aucun traitement, soit 46 p. 100.

Les 8 autres individus sont morts pendant le traitement ou moins de quinze jours après la fin de celui-ci. Il n'a donc été observé que de « faux échecs » de la vaccination. En outre,

3 seulement de ces 8 mordus avaient suivi le traitement complet prescrit, mais s'étaient présentés à la consultation huit jours, dix-neuf jours et soixante-quatorze jours après la morsure.

*Incubation* : Le temps qui s'est écoulé entre la morsure et l'apparition des premiers symptômes de rage a varié entre quatorze jours (morsure à la face) et cent trois jours (morsure superficielle du pied droit).

La moyenne observée fut de trente et un jours pour le bras (une seule observation), trente-six jours pour la tête et la face (4 observations), quarante jours pour la jambe (une seule observation), quarante-six jours pour la main et l'avant-bras (4 observations) et cent trois jours pour le pied (une seule observation).

Dans l'ensemble, la période d'incubation est plus longue que dans la rage observée au Vietnam, en particulier en ce qui concerne les morsures à la tête.

*Evolution* : Pour 11 mordus, l'évolution de la maladie a pu être suivie et le décès survint après un jour dans 5 cas, deux jours dans 5 cas et quatre jours dans 1 cas.

*Accidents* : Le vaccin fourni par l'Institut Pasteur de Brazzaville est un produit répondant aux normes exigées par l'O. M. S.

Aucun incident sérieux n'a été observé du fait de son application pendant les cinq dernières années.

#### CONCLUSIONS.

Nous avons ainsi envisagé l'activité de l'Institut Pasteur de Brazzaville dans la lutte contre la rage en A. E. F. depuis 1953. Mais, depuis de très nombreuses années, l'étude de la rage représente une part importante de l'activité de cette Maison. Pendant longtemps l'Institut Pasteur fut seul pour diagnostiquer cette maladie et produire le vaccin en A. E. F. La fabrication de vaccin formolé à usage vétérinaire par le laboratoire de Farcha ne remonte en effet qu'à quelques années.

La fréquence des cas de rage animale est relativement élevée, ainsi qu'en témoigne le pourcentage des inoculations positives expérimentales.

Nous sommes encore mal renseignés sur le rôle des animaux sauvages en A. E. F. dans la conservation et la transmission du virus. L'infection humaine n'a jamais été constatée formellement qu'à partir de l'animal domestique. Elle est loin d'être négligeable et le faible nombre de décès connus ne doit pas faire sous-estimer le problème et retarder la mise en application des mesures de réglementation sanitaire.

Les animaux domestiques, notamment chiens et chats, doivent pouvoir être protégés par des vaccinations suffisamment répétées.

La vaccination des animaux n'a malheureusement pas été rendue obligatoire sur le territoire de la Fédération, et si la plupart des chiens et chats appartenant aux Européens sont régulièrement immunisés, il n'en est pas de même des animaux appartenant aux Africains, surtout dans les villages de brousse. Or, il est bien évident qu'une prophylaxie de la rage humaine est essentiellement du ressort des services vétérinaires. Indépendamment de la vaccination, le ramassage et l'abatage de tous les chiens errants dans les agglomérations constitueraient aussi une mesure prophylactique de grande valeur, mais dont l'application ne semble pas proche.

En matière de vaccination humaine, les demandes de vaccin ont toujours pu être satisfaites sans délais, malgré les difficultés de transport, grâce à l'obligeante collaboration des compagnies de transports aériens civiles ou militaires.

Mais ce qui a été fait jusqu'à présent pour protéger la population contre la rage est encore insuffisant. Une action énergique des pouvoirs publics est indispensable pour obtenir une vaccination efficace des animaux domestiques et la suppression des animaux faméliques et errants. Une propagande persuasive et d'éducation du public doit aussi être mise en œuvre par les médecins, vétérinaires et leurs auxiliaires pour que toutes les morsures soient signalées et rationnellement traitées.

Ainsi seulement pourrait être envisagée, dans un proche avenir, une régression de la rage humaine en A. E. F.

## SUMMARY

### RABIES IN FRENCH EQUATORIAL AFRICA DURING THE LAST FIVE YEARS.

The two sections of the paper describe the participation of the Brazzaville Pasteur Institute in the fight against rabies. Since many years indeed, the study of rabies constitutes a very important part of the activity of this Institute. For a long time the Pasteur Institute was the only laboratory in charge of the diagnosis of rabies and vaccine production. Since a few years, the preparation of the formolized vaccine is realized by the Farcha laboratory.

The incidence of animal rabies is still high. It seems impossible to-day to suppress the disease, since wild animals represent a permanent reservoir of virus. However, it should be possible to protect domestic animals, particularly dogs and cats, by repeated inoculations. Unfortunately, antirabic vaccination is not compulsory in the Federation: if most dogs belonging to Euro-

peans are regularly vaccinated, animals belonging to Africans are not. It is evident that prophylaxis of rabies in human depends on the first place on animal vaccination.

Independently of vaccination, catching and killing of all stray dogs would also be a prophylactic measure.

Demands for human vaccine have always been met with immediately.

At any rate, the population is still insufficiently protected against rabies. It belongs to the authorities to enforce effectual vaccination of domestic animals and destruction of stray animals.

Physicians and veterinarians should persuade the natives to report all bites, in order to have them rationally treated.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 804.
- [2] ANDO (K.), ISHII (K.), IRISAWA (J.), SHIMADA (K.) et KATO (T.). *Japan. J. Med. Sci.*, 1953, **6**, 221.
- [3] ANDO (K.), ISHII (K.), OKA (Y.), IRISAWA (J.), SHIMADA (K.), KATO (T.) et MURAKAMI (H.). *Japan. J. Med. Sci.*, 1953, **6**, 659.
- [4] GIACOSA DE CRESCINI (A. M.). *Rev. Med. Veter.*, 1955, **37**, 263.
- [5] ATANASIU (P.). [Communication personnelle.]
- [6] DEPOUX (R.) et MERVEILLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 182.
- [7] DEPOUX (R.) et ORIO (J.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1958, **51**, 157.
- [8] CECCALDI (J.). *Rapp. Fonct. Tech. Inst. Past. Brazzaville*, 1953.
- [9] CECCALDI (J.). *Rapp. Fonct. Tech. Inst. Past. Brazzaville*, 1954.
- [10] CECCALDI (J.). *Rapp. Fonct. Tech. Inst. Past. Brazzaville*, 1955.
- [11] HEULS (J.). *Rapp. Fonct. Tech. Inst. Past. Brazzaville*, 1956.
- [12] DEMARCHI (J.). *Rapp. Fonct. Tech. Inst. Past. Brazzaville*, 1957.
- [13] Note technique 1 347 D. G. S. P. du 20 juillet 1957.
- [14] *La rage : techniques de laboratoire*, Monographie O. M. S., n° 23, 1955.

**ÉTUDE CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE  
SUR LA STÉATOSE HÉPATIQUE DES CHIMPANZÉS  
MORTS EN CAPTIVITÉ A L'INSTITUT PASTEUR  
DE KINDIA (1950-1956)**

par G. LEFROU et V. MICHARD (\*).

*(Institut Pasteur de Kindia)*

Comme suite à l'étude déjà parue dans cette revue [4] sur les causes de mortalité des chimpanzés en captivité à l'Institut Pasteur de Kindia, nous devons maintenant attirer l'attention sur la fréquence de la stéatose hépatique qui a été constatée lors de la pratique systématique des nécropsies, avec examen histopathologique.

Ainsi, sur 100 chimpanzés morts en captivité de 1950 à 1956, il a été constaté, par examens histopathologiques, 53 cas de stéatose hépatique plus ou moins accentuée.

Sur ces 53 cas nous donnons ci-dessous les résultats de 23 examens histo-pathologiques du foie les plus caractéristiques au cours de ces années 1950-1956.

OBSERVATION I. — Nani. Femelle. Taille, 63 cm. Poids, 6,200 kg. Durée de captivité, treize mois. 8 mars 1950, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 125 g.* Le parenchyme hépatique témoigne d'une dégénérescence grasseuse très importante intéressant la totalité des lobules, mais trouvant son maximum d'intensité dans les zones médio-lobulaires où se voient d'énormes vacuoles adipeuses. Les capillaires radiés sont congestifs et encombrés de polynucléaires. On ne note pas de majoration des espaces porto-biliaires. Ces phénomènes congestifs vont jusqu'à la constitution de vastes plages hémorragiques.

En conclusion, il s'agit d'une affection de type broncho-pneumonie avec dégénérescence grasseuse massive du parenchyme hépatique (hépatite toxi-infectieuse).

OBS. II. — Mamou. Femelle. Taille, 67 cm. Poids, 11,300 kg. Durée de captivité, dix-huit jours. 16 avril 1950, entéro-colite.

*Foie : poids, 139 g.* L'altération majeure réside en des phénomènes congestifs portant sur les systèmes sus-hépatiques. Les capillaires sont

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mai 1958.



ectasiques et compriment les travées hépatiques. Les cellules présentent des vacuoles graisseuses. Surcharge graisseuse.

Obs. III. — Dabola. Femelle. Taille, 64 cm. Poids, 8,100 kg. Durée de captivité, huit mois. 30 juin 1950, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 162 g.* Dégénérescence graisseuse surtout accentuée dans les zones médio-lobulaires (chaque veine centro-lobulaire est entourée d'une couronne de cellules hépatiques normales). Dans les capillaires radiés on trouve des éléments inflammatoires, mais le réseau kupfférien n'est pas majoré.

Obs. IV. — L. L. Mâle. Taille, 68 cm. Poids, 9,500 kg. Durée de captivité, dix mois. 8 août 1950, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 252 g.* Dégénérescence graisseuse massive qui n'épargne que quelques cellules centro-lobulaires, en particulier la bande péri-sus-hépatique. Cette dégénérescence est uni- ou multi-vacuolaire, les cellules à grande vacuole unique se situant surtout dans les zones médio-lobulaires. La congestion est intense, portant sur les systèmes veineux porte et sus-hépatique, sur les capillaires radiés. Le réseau kupfférien est faiblement réactionnel. En résumé, hépatite du type toxi-infectieux.

Obs. V. — Goumba. Femelle. Taille, 87 cm. Poids, 10,600 kg. Durée de captivité, deux mois. 15 septembre 1950, néphrite chronique.

*Foie : Poids, 255 g.* Conserve sa topographie normale, les cellules présentent dans toutes les zones médio-lobulaires des images de dégénérescence graisseuse. Autour de la veine centro-lobulaire on retrouve un ou deux rangs de cellules normales, ainsi qu'au voisinage des espaces portes. Les vaisseaux, veines et capillaires, sont ectasiés et on retrouve des amas pigmentaires de nature hématique au voisinage des espaces portes.

Obs. VI. — Yemouna. Femelle. Taille, 51 cm. Poids, 3,300 kg. Durée de captivité, deux mois et demi. 4 avril 1951, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 112 g.* Les deux prélèvements témoignent essentiellement d'une dégénérescence graisseuse importante à localisation plutôt péri-portale. Le contingent de cellules glandulaires pas ou peu vacuolisées peut être évalué à  $1/4$  ou  $2/3$ . Il convient également de noter une hyperplasie des cellules de Kupffer, une cholostase intra-lobulaire et une congestion modérée des vaisseaux portes.

Obs. VII. — Kirita. Mâle. Taille, 79 cm. Poids, 12,900 kg. Durée de captivité, 4 mois. 18 mai 1951, entéro-colite.

*Foie : poids, 326 g.* Congestion et surtout dégénérescence graisseuse multi-vacuolaire de type toxique de tout le parenchyme hépatique, sans localisation élective dans les lobules et sans signes inflammatoires surajoutés.

Obs. VIII. — Tamya. Femelle. Taille, 72 cm. Poids, 8 kg. Durée de captivité, un mois. 10 juillet 1951, cachexie.

*Foie : poids, 280 g.* Dégénérescence grasseuse de la totalité des cellules hépatiques du type multi-vacuolaire rappelant, par certains côtés, les aspects en chaton de bague observés dans les syndromes de dénutrition.

Obs. IX. — Toumba. Mâle. Taille, 66 cm. Poids, 6,500 kg. Durée de captivité, six mois et demi. 13 juillet 1951, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 315 g.* Enorme dégénérescence grasseuse de la totalité des cellules glandulaires du type univacuolaire, les cellules les plus dégénérées étant dans la zone périportale. Pas d'images d'hépatite interstitielle surajoutée.

Obs. X. — I. F. A. C. Femelle. Taille, 56 cm. Poids, 4 kg. Durée de captivité, trois mois. 10 septembre 1951, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 128 g.* Congestion, surcharge adipeuse d'un contingent notable de cellules hépatiques, en particulier dans les régions moyennes des lobules sans dissociation trabéculaire ou nécrose. Infiltrat périportal à polynucléaires, quelques micro-abcès à polynucléaires intra-parenchymateux.

Obs. XI. — Kuyeyä. Mâle. Taille, 66 cm. Poids, 5 kg. Durée de captivité, huit jours. 1<sup>er</sup> octobre 1951, hépatite avec ictère.

*Foie : poids, 120 g.* Nécrose aiguë hépatique (à type ictère grave avec œdème). Dissociation trabéculaire, dégénérescence grasseuse et nécrobiose de la totalité des cellules glandulaires.

Obs. XII. — Foresta. Femelle. Taille, 77 cm. Poids, 9,500 kg. Durée de captivité, trois mois et demi. 30 octobre 1951, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 275 g.* Surcharge grasseuse, univacuolaire étendue à la presque totalité des cellules hépatiques, quelques éléments normaux subsistent des veines centro-lobulaires, infiltrat polymorphe.

Obs. XIII. — Linsan. Mâle. Taille, 67 cm. Poids, 6 kg. Durée de captivité, un mois et demi. 11 janvier 1952, entéro-colite.

*Foie : poids, 160 g.* Congestion, surcharge ou dégénérescence grasseuse généralement univacuolaire, intéressant la totalité des cellules périportales et un contingent notable des éléments des régions moyennes et centrales des lobules.

Obs. XIV. — Korse. Mâle. Poids, 27 kg. Durée de captivité, sept mois. 13 mars 1952, cachexie.

*Foie : poids, 580 g.* Surcharge lipidique à vacuoles multiples de la totalité des cellules glandulaires avec ou sans atteinte nucléaire. A noter que les cellules centro-lobulaires sont moins chargées de graisse que les autres éléments du lobule. Pas d'image infectieuse surajoutée. Rares micro-filaires dans les capillaires radiés.

Obs. XV. — Kamissa. Femelle. Taille, 98 cm. Poids, 16 kg. Durée de captivité, quatre mois. 23 juillet 1952, entéro-colite.

*Foie : poids, 448 g.* Toxi-infectieux, avec stéatose généralisée.

OBS. XVI. — Mamou. Mâle. Taille, 63 cm. Poids, 6 kg. Durée de captivité, trois mois. 28 mai 1953, entéro-colite.

*Foie : poids, 160 g.* Ce foie témoigne d'un degré notable de cirrhose insulaire ; il est fortement congestif, surtout dans tout son système sus-hépatique, et l'on y note une stéatose marquée sans localisation lobulaire élective. Les espaces portes sont assez largement infiltrés d'éléments lymphocytaires. Au total, foie d'hépatite toxi-infectieuse.

OBS. XVII. — Tati. Mâle. Taille, 58 cm. Poids, 4 kg. Durée de captivité, un mois. 13 juin 1953, pneumonie et dénutrition.

*Foie : poids, 145 g.* Stéatose généralisée univacuolaire ressemblant assez bien au foie de malnutrition des bébés africains.

OBS. XVIII. — Dioulde. Mâle. Taille, 55 cm. Poids, 3 kg. Durée de captivité, vingt-cinq jours. 13 juillet 1953, cachexie.

*Foie : poids, 85 g.* Stéatose périportale notable. Congestion, signes diffus d'hépatite interstitielle.

OBS. XIX. — Kokulo. Mâle. Taille, 74 cm. Poids, 9,100 kg. Durée de captivité, quatre mois. 14 décembre 1953, cachexie.

*Foie : poids, 385 g.* Septicémique ; nécrose et hémorragie intéressant la majorité du parenchyme hépatique, présence de quelques îlots de cellules non encore nécrosées, mais sièges d'une stéatose à petites vacuoles.

OBS. XX. — Dabola. Mâle, 77 cm. Poids, 7 kg. Durée de captivité, trois mois. 26 décembre 1955, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 337 g.* Hépatite aiguë nécrosante avec stéatose mûriforme ou nécrose acidophile de la totalité des cellules hépatiques.

OBS. XXI. — Kaleta. Femelle. Taille, 61 cm. Poids, 4,700 kg. Durée de captivité, un mois et demi. 15 juillet 1956, dénutrition.

*Foie : poids, 123 g.* Stéatose à prédominance périportale, univacuolaire, assez analogue à celle des malnutritions (kwashiorkor africain).

OBS. XXII. — Monoma III. Taille, 55 cm. Poids, 4,800 kg. Durée de captivité, trois mois. 4 juin 1956, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 125 g.* Congestion, tuméfaction et clarification des cellules hépatiques qui sont, pour certaines, stéatosiques. Pas d'infiltrat interstitiel notable.

OBS. XXIII. — Telimetune. Taille, 64 cm. Poids, 5,800 kg. Durée de captivité, deux mois et dix-sept jours. 25 octobre 1956, broncho-pneumonie.

*Foie : poids, 164 g.* Congestif, stéatosique à vacuoles multiples.

#### DISCUSSION.

A l'examen macroscopique, la dégénérescence grasseuse du foie se traduit par une coloration jaunâtre et une consistance pâteuse. Le volume du foie peut être normal. L'organe est hyper-

trophié si, par suite de l'accumulation de graisse à l'intérieur des cellules, celles-ci sont elles-mêmes augmentées de volume ; il est atrophié si les cellules ont été atteintes de nécrose. Dans certaines affections, le foie est au début hypertrophié, puis l'évolution aboutit à l'atrophie.

A l'examen microscopique, la dégénérescence consiste en une infiltration de la cellule hépatique par de fines gouttelettes graisseuses, les protoplasmes pouvant présenter une ou plusieurs gouttelettes : dégénérescence uni- ou multi-vacuolaire.

On admettait autrefois que la présence de nombreuses gouttelettes correspondait à la dégénérescence graisseuse, alors que les grosses gouttes étaient propres à la surcharge. A l'heure actuelle, cette façon de voir n'est plus adoptée, et il est admis que seul l'état de la cellule doit entrer en ligne de compte dans la distinction entre surcharge et dégénérescence graisseuse. Lorsque les corps gras se trouvent dans une cellule normale par ailleurs, on parle de surcharge, et lorsque les cellules présentent des signes de désintégration (dégénérescence du noyau ou du cytoplasme), on emploie le terme de dégénérescence.

Ainsi, sur 41 examens, l'anatomo-pathologiste a distingué 31 stéatoses avec dégénérescence et 10 stéatoses avec surcharge seulement. Sur les 31 cas de dégénérescence il a été spécifié, sept fois, dégénérescence du type des hépatites toxi-infectieuses.

ETIOLOGIE. — Comme première observation d'ordre général, il faut remarquer que tous les chimpanzés morts en captivité à Pastoria, sont, *sauf exception*, de *jeunes chimpanzés*.

Ainsi sur les 100 morts enregistrées, il y a eu seulement 4 morts d'adultes. Si l'on considère la taille des chimpanzés qui constitue un des éléments permettant d'avoir une notion de l'âge, il est constaté que la taille a varié de 40 cm à 98 cm ; ce qui permet de conclure que l'âge des chimpanzés se situe entre six mois et trois ans.

Donc, *il s'agit d'une stéatose hépatique survenue chez de jeunes chimpanzés.*

★★

Chez les chimpanzés en captivité, deux facteurs essentiels sont à considérer en ce qui concerne la stéatose hépatique :

- 1° L'affection ayant entraîné la mort ;
- 2° La durée de captivité.

Enfin, la stéatose hépatique dans les états de dénutrition mérite une mention spéciale en fonction de la durée de captivité.

## 1° STÉATOSE HÉPATIQUE SUIVANT L'AFFECTION.

Le tableau I donne, par année, les stéatoses hépatiques suivant la nature de l'affection. Comme nous l'avons exposé, dans le mémoire consacré à la mortalité des chimpanzés, trois affections dominent la pathologie des chimpanzés en captivité : les affections pulmonaires, les affections intestinales, les états de dénutrition.

TABLEAU I. — Stéatose hépatique et affection mortelle.

	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	TOTAL
TOTAL DES MORTS	12	16	14	21	12	18	7	100
Affection pulmonaire	8	9	4	11	7	13	4	56
Stéatose	5	7	1	6	3	4	3	29
Affection intestinale	2	2	8	1	0	1	1	15
Stéatose	1	2	7	1	0	0	0	11
Dénutrition	1	2	1	8	4	4	1	21
Stéatose	1	0	1	3	1	1	1	8
Divers	1	2	1	1	1	0	2	8
Stéatose	1	2	0	1	0	0	1	5
TOTAL STÉATOSE	8	11	9	11	4	5	5	53

En examinant ce tableau, il faut immédiatement constater que, dans les affections en cause, la stéatose hépatique n'est pas une lésion constante.

Ainsi sur 52 morts par affection pulmonaire, il y a eu 26 cas de stéatose hépatique, soit 50 p. 100.

Sur 14 morts par affection intestinale, 11 cas de stéatose hépatique, soit 78,5 p. 100. La propriété qu'a le foie d'arrêter les poisons et les toxines microbiennes le rend accessible à tous les poisons stéatosants qui, formés par l'intestin, sont apportés par la veine porte. Ainsi, la dégénérescence graisseuse du foie est particulièrement fréquente dans toutes les maladies du foie et de l'intestin.

Sur 18 morts par dénutrition, 5 cas de stéatose hépatique, soit 21, p. 100.

Au cours de diverses maladies humaines et vétérinaires infectieuses il est fréquent de constater que le foie est atteint de congestion et de lésions cellulaires caractérisant le foie dit infectieux. Les hépatites infectieuses constatées chez les chimpanzés rentrent dans cette catégorie.



Pour les broncho-pneumonies, les lésions du foie infectieux sont particulièrement typiques dans les observations I, III et IV. Par contre, dans les observations VI, IX et XII il s'agit surtout de dégénérescence graisseuse. Les observations XV et XVI montrent que dans les affections intestinales, de type entéro-colite, le foie peut présenter aussi les caractéristiques du foie infectieux. Enfin, dans les observations VII et XIII il s'agit simplement de dégénérescence graisseuse du foie.

## 2° STÉATOSE HÉPATIQUE SUIVANT LA DURÉE DE CAPTIVITÉ.

Comme notion générale sur les stéatoses hépatiques en rapport avec la durée de captivité il est nécessaire de rappeler les données exposées dans le premier mémoire paru concernant la mortalité totale pendant les années 1950-1956.

Il est ainsi fait état dans ce mémoire de 100 morts dont la répartition par rapport à la durée de captivité a été la suivante.

	MORTS SUR 100
Première quinzaine .....	21
Deuxième quinzaine .....	11
Premier mois .....	14
Deuxième mois .....	2
Troisième mois .....	10
Quatrième mois .....	9
Cinquième mois .....	6
Sixième mois .....	2
Septième mois .....	4
Huitième mois .....	3
Neuvième mois .....	0
Dixième mois .....	1
Onzième mois .....	0
Un an à deux ans .....	6
Deux ans et plus .....	1

Les renseignements sur l'incidence de la stéatose hépatique sont fournis par le tableau II.

Sur 21 chimpanzés morts au cours de la première semaine de captivité il a été constaté 3 stéatoses hépatiques, dont 2 à l'occasion de 2 broncho-pneumonies et la troisième consécutive à une hépatite toxi-infectieuse d'origine indéterminée.

Sur un total de 14 chimpanzés morts pendant la deuxième semaine, il a été constaté 6 stéatoses hépatiques se rapportant à 4 broncho-pneumonies et 2 entérites. Et pour 14 chimpanzés morts au cours du premier mois, il a été constaté 7 stéatoses, en rapport avec 3 broncho-pneumonies, 2 entéro-colites, 2 états de dénutrition.

Ainsi, à partir du premier mois de captivité se pose le pro-

blème du régime alimentaire comme facteur de la stéatose, dite stéatose nutritionnelle.

TABLEAU II. — Stéatose hépatique et durée de captivité.

Durée de captivité	1950		1951		1952		1953		1954		1955		1956		TOTAL	
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
1 <sup>er</sup> au 15 <sup>e</sup> jour	2	0	2	1	1	0	8	2	3	0	4	0	1	0	21	3
16 <sup>e</sup> au 30 <sup>e</sup> jour	1	1	2	1	0	0	5	3	2	1	4	0	0	0	14	6
1 mois	2	1	0	0	4	3	4	2	2	1	2	0	0	0	14	7
2 mois	2	1	1	1	0	0	1	1	4	2	1	1	0	0	9	6
3 mois	0	0	3	3	2	1	1	1	0	0	2	1	2	2	10	8
4 mois	0	0	3	2	3	2	1	1	0	0	2	1	0	0	9	6
5 mois	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	3	3	6	4
6 mois	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1
7 mois	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	3
8 mois	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	3	3
9 mois	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 mois	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
11 mois	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 mois	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 an et plus	2	3	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	1	0	6	5
2 ans et plus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAUX :	12	8	16	11	14	9	21	11	12	4	18	5	7	5	100	53

M = morts. S = stéatose.

### 3° STÉATOSE NUTRITIONNELLE.

Le Centre de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation a choisi comme sujet de travail des Journées Scientifiques de 1953 (24-25-26 mai 1953) : *Physiologie, Pathologie, Chimie et Cytologie des foies gras*, et un recueil des communications a été publié, en 1954, par le Centre National de Recherche Scientifique [2]. Nous y avons puisé des données d'autant plus importantes que chaque communication comporte une vaste bibliographie.

La communication la plus intéressante pour le sujet en cause est celle de M<sup>lle</sup> Beauvallet : « Le foie gras par action sur l'état nutritionnel ».

Mais nous devons compléter la bibliographie par deux articles médicaux [3, 4].

Depuis un temps indéterminé, remontant pour le moins aux Egyptiens, on sait que l'on peut produire, chez les animaux, des foies gras avec un régime de déséquilibre alimentaire, et le plus bel exemple est le foie gras d'oie, obtenu par gavage, c'est-à-dire par ingestion forcée de maïs ; sa durée est de trois à quatre semaines.

On connaît aussi une maladie des foies gras des bovins appelée maladie de Duren, du nom de la ville rhénane où elle fut identifiée, et qui est due à une suralimentation par la farine de soja, riche en protides, mais carencée en méthionine.

Par ailleurs, il a été possible de reproduire, chez les lapins et les rats, des cirrhoses avec stéatose en dehors de toute ingestion de toxique, par un régime déséquilibré riche en graisse et pauvre en protéines.

En médecine humaine, les travaux modernes sur la stéatose hépatique ont permis de différencier divers types de foie gras : stéatose infectieuse ou toxique, stéatose hormonale, stéatose nutritionnelle.

Une des stéatoses hépatiques les plus étudiées est celle en rapport avec l'intoxication alcoolique, cette stéatose aboutissant généralement à la cirrhose. Mais le mécanisme physio-pathologique de la stéatose du foie chez les alcooliques est loin d'être élucidé et on est enclin à penser que l'intoxication éthylique n'agit que par des facteurs indirects nutritionnels.

En pathologie tropicale, une certaine maladie atteignant les jeunes enfants noirs, à la période de sevrage, a fait beaucoup parler d'elle ces années dernières sous le vocable bizarre de kwashiorkor, qui signifierait enfants nés le dimanche (kwashi) et rouges (oko) en langage de la tribu des Achantis (Ghana).

Cette maladie est caractérisée soit par l'exfoliation épidermique généralisée donnant aux enfants l'apparence de brûlure du deuxième degré (enfant rouge), soit par un syndrome pellagroïde, soit simplement par des œdèmes et des bouffissures (bouffissures d'Annam).

Sous ces apparences cliniques assez variées, cette affection présente une constante nécropsique qui a frappé les observateurs : c'est la dégénérescence graisseuse du foie qui, d'après les travaux récents, s'accompagnerait aussi de lésions du pancréas caractérisées par une atrophie des cellules acineuses.

Si certains symptômes observés peuvent être attribués à une carence d'utilisation de diverses vitamines, ces faits paraissent secondaires à l'atteinte hépatique qui constituerait la lésion primordiale de l'affection. La stéatose hépatique serait due à une alimentation stéatogène, du fait qu'elle serait trop riche en hydrates de carbone et en graisses par rapport aux protéines

animales. Par ailleurs, parmi les lipides, ce seraient les acides gras saturés qui seraient stéatogènes.

Comme facteur étiologique du kwashiorkor, il faut considérer qu'il est bien acquis que le bébé noir passe sans transition du sein maternel à la gamelle familiale; or celle-ci contient surtout du mil, du riz, du maïs additionnés d'huiles diverses; les protéines animales sont toujours peu abondantes.

Il nous a paru intéressant de prendre en considération ces notions dans le domaine du régime alimentaire auquel sont soumis les chimpanzés de Pastoria. D'abord, comme point de départ, il faut remarquer que les chimpanzés chez lesquels on a observé ces hépatites graisseuses sont de tout jeunes chimpanzés, de 6 mois à 3 ans, dont une approximation de l'âge peut être donnée par la taille et la chronologie dentaire.

Ensuite, il faut considérer que la nourriture qui est donnée aux jeunes chimpanzés suit exactement la suppression du lait maternel comme chez les bébés noirs.

En tenant compte de ce que les chimpanzés sont, théoriquement, essentiellement végétariens, la ration alimentaire à Pastoria a été établie par tâtonnements et en se basant du point de vue énergétique sur certaines rations accordées à des travailleurs en A. O. F.

En disant que les chimpanzés sont végétariens, il faut cependant noter que des observateurs ont remarqué que, dans la brousse, le chimpanzé mangeait des insectes, des larves, des chenilles, des œufs et certains ont même ajouté, des oiseaux ou des rats. A Pastoria, pour des chimpanzés de 6 à 8 kg, n'ayant que leurs dents lactéales, la ration quotidienne est la suivante.

Arachides en coques .....	50 g
Bananes ou mangues .....	1 000 g
Patates cuites .....	500 g
Riz .....	150 g
Huile de palme .....	10 g
Sel .....	5 g

A cette ration il est ajouté :

Viande : deux fois par semaine, 100 g.

Foie (riche en méthionine, facteur lipotrope) : une fois par semaine, 100 g.

Comme tous les jeunes chimpanzés sont pesés régulièrement tous les quinze jours, il a été constaté que la ration allouée donnait toute satisfaction, puisque dans l'ensemble les chimpanzés prenaient ainsi régulièrement du poids.

Mais, ceci étant, il n'en reste pas moins vrai que tous ces animaux en bon état de santé apparent semblent être prédisposés aux hépatites graisseuses.

En dehors d'un déséquilibre pouvant exister dans les apports glucides, lipides, notre attention a été attirée sur le facteur huile de palme, et nous nous sommes demandé si celle-ci ne serait pas particulièrement riche en acides gras saturés admis comme essentiellement stéatogènes.

Nous avons trouvé les renseignements demandés dans le *Précis de Biologie*, de Cristol (édition 1948).

ACIDES GRAS SATURÉS	HUILE D'ARACHIDE P. 100	HUILE DE PALME P. 100
—	—	—
Acide laurique .....		45 à 55
Acide myristique ....		12 à 35
Acide palmitique ....	4 à 7	9
Acide stéaritique ....	3 à 5,5	1,7
Acide arachidique ...	2,3 à 3,5	—

Ainsi l'huile de palme contient une forte quantité d'acides gras saturés, alors que l'huile d'arachide en renferme très peu (il est nécessaire de noter que dans la brousse les chimpanzés mangent les fruits du palmier à huile, mais la proportion des lipides dans la pulpe du fruit n'est certainement pas la même que dans l'huile).

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de remplacer l'huile de palme par l'huile d'arachide, quoique le prix de cette denrée soit plus élevé. La substitution s'est faite en septembre 1950. Dans la suite, il n'est pas apparu que ce changement avait modifié l'évolution des stéatoses au cours des années suivantes.

★  
★★

*En résumé*, il est intéressant de faire remarquer que la stéatose hépatique constatée chez les chimpanzés est analogue, à plusieurs égards, à celle du kwashiorkor des enfants africains.

Cette ressemblance est particulièrement nette dans les observations VIII, XVII et XXI ci-dessus.

Le chimpanzé apparaît l'animal de choix pour l'étude des stéatoses nutritionnelles.

## SUMMARY

CLINICAL AND HISTOLOGICAL STUDY OF FATAL HEPATIC STEATOSIS  
IN CHIMPANZEES KEPT  
AT THE PASTEUR INSTITUTE, KINDIA (1950-1956).

The hepatic steatosis observed in chimpanzees is similar in some ways to that observed in kwashiorkor in African children.

This analogy is particularly evident in the observations VIII, XVII and XXI.



The chimpanzees seem to be the animals of choice for the study of steatosis.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEFROU (G.) et MICHARD (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 502.
  - [2] *Physiologie, Pathologie, Chimie et Cytologie des Foies gras. Journées Scientifiques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation* (24-25 et 26 mars 1953), 1 vol. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1954.
  - [3] CLÉMENT (R.). *Presse méd.*, 23 décembre 1951.
  - [4] ALBOT (H.) et CORTEVILLE. *Presse méd.*, 22 avril 1953.
-

## RECHERCHES SUR LES *SALMONELLA* ET *ARIZONA* HÉBERGÉES PAR LES VIPÈRES DE FRANCE

par L. LE MINOR, M. A. FIFE et P. R. EDWARDS (\*)  
(avec la collaboration technique de Ch. CHARIÉ-MARSAINES).

(*Institut Pasteur de Paris et Communicable Disease Center,  
Public Health Service, U. S. Department of Health,  
Education and Welfare, Atlanta, Georgia*)

### MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Nous avons examiné des prélèvements de 310 vipères (*Vipera aspis*) adressées à l'Institut Pasteur pour la collecte du venin en vue de la fabrication du sérum antivenimeux. Ces vipères provenaient de divers départements français (Gers, Jura, Maine-et-Loire, Loire-Atlantique, Vendée). Dès l'arrivée de ces animaux, le venin était recueilli. Nous avons aussitôt après prélevé dans une boîte de Petri, pour chaque animal, un mélange d'urine, de matières fécales et, éventuellement, de sperme, obtenu par compression du corps de l'animal. Sur ce matériel, nous avons versé 10 cm<sup>3</sup> de milieu d'enrichissement de Müller-Kauffmann. Après dix-huit heures d'incubation à 37° celui-ci a été repiqué sur milieu S. S.

Le diagnostic d'orientation a été fait de la manière suivante : après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, 6 colonies SH<sub>2</sub> positives, que le pourtour soit incolore ou rosé, ont été individuellement repiquées sur milieu à l'urée de Ferguson additionné de tryptophane, dit urée-indol [1]. Les tubes présentant une alcalinisation précoce ou tardive étaient rejetés et les autres repiqués sur milieux lactose-glucose-SH<sub>2</sub> et « mannitol-mobilité ». Si la culture avait les caractères suivants : uréase —, indol + ou —, mobile, mannitol +, lactose + ou —, glucose + gaz, SH<sub>2</sub> + nous recherchions directement sur milieu lactose-glucose-SH<sub>2</sub> si elle possédait une lysine-décarboxylase [2] : ceci pour éliminer les *E. freundii*. Cette dernière réaction, effectuée suivant la méthode

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mai 1958.

de Carlquist [3] est extrêmement fidèle : positive avec les *Salmonella*, *Arizona*, elle est négative avec les *E. freundii* (y compris *Ballerup-Bethesda*). Nous avons rejeté les souches LDC — ne poursuivant l'étude que de celles qui sont LDC +.

Avant d'entreprendre l'étude biochimique complète, nous avons effectué, par mesure de sécurité, sur milieu S. S. un nouvel isolement des cultures suspectes d'être des *Salmonella* ou des *Arizona* et avons réensemencé une colonie sur eau peptonée, gélose et milieu de conservation de Kauffmann. A partir de l'eau peptonée ou de la gélose nous avons ensemencé les milieux suivants : urée-indol, milieu au CNK, milieu de Carlquist [3], eau peptonée additionnée de bleu de bromothymol et de 0,5 p. 100 de : xylose, arabinose, adonitol, rhamnose, glucose, mannitol, sorbose, sorbitol, dulcitol, maltose, lactose (0,5 et 10 p. 100), maltose, saccharose, tréhalose, inositol, salicine, milieu au glycérol de Stern, milieu de Clark et Lubs, milieu au D-tartrate de Kauffmann, gélose au sous-acétate de plomb, milieu au nitrate. La production d'indol était recherchée d'une part sur milieu « urée-indol », d'autre part sur eau peptonée, au moyen du réactif de Kovacs. Pour mettre en évidence la protéolyse de la gélatine, nous avons utilisé la gélatine au charbon de Kohn [4] placée à 37° dans une suspension épaisse de bactéries additionnée de toluène (modification de Lautrop [5]). Cette méthode est bien plus rapide que la méthode classique à 18°, que nous avons employée comparativement pour environ la moitié de nos souches : une réaction positive se manifeste en trois à sept jours au lieu de trois à six semaines.

#### RÉSULTATS.

Sur 310 prélèvements de vipères, 139, soit 44,8 p. 100 contenaient des *Arizona*, des *Salmonella* ou les deux à la fois : 271 souches d'*Arizona* et 5 de *Salmonella* ont été étudiées. La flore associée ne semble pas présenter qualitativement de particularité évidente. Nous avons trouvé de nombreux *E. coli*, des *Klebsiella*, *Cloaca*, *Proteus mirabilis* et *vulgaris*, *morgani*, *rettgeri*, *Providencia*, *Hafnia*.

#### SÉROTYPES D'*Arizona*.

A propos de chacun, nous signalerons éventuellement les caractères biochimiques atypiques ne correspondant pas à ceux qui entrent dans la définition du groupe *Arizona* [6]. Tous les caractères autres que ceux-ci, recherchés par les méthodes que nous avons indiquées, sont typiques. Le lactose 0,5 p. 100 fut, pour la grande majorité des souches, fermenté en un jour. Nous

mentionnerons les fermentations plus tardives observées avec quelques souches de certains sérotypes (V. tableau).

Sérotypes	Nombre de vipères	Nombre, de cultures	Particularités biochimiques		
			Indol +	Saccharose +	Autres
1,4:24:25 (N.T.)	1	1			
1,2:26:31	1	4	4		
7:27:31	9	13	4		
7:27:38 (N.T.)	2	3		3	
9:26:21	1	1	1		1 CNK +
9:33:31 (N.T.)	25	43	2		
10a 10c:1,2,5,6 (N.T.)	1	2			2 CNK +
12:27:28 (N.T.)	57	83	1	1	
16:24:31	7	12			
19:22:31 (N.T.)	16	30	30	6	
20:24:21 (N.T.)	2	4			
21:23:25 (N.T.)	3	4			
25:23:21	5	6	6		
25:23:30 (N.T.)	12	16	2		
26:33:25 (N.T.)	20	32			
28:23:25 (N.T.)	10	17	4		sorbitol <sup>+</sup> 4-10
Non déterminé	6	6	1		
	139 (associations)	277	55	10	

1,4:24:25 (nouveau type [7]) : 1 souche.

1,2:26:31 : 4 souches provenant d'une même vipère. Elles produisent de l'indol.

7:27:31:13 souches provenant de 9 vipères. Quatre d'entre elles, provenant de 3 vipères différentes originaires du Gers et de Vendée, produisent de l'indol. D'autres souches de ce sérotype provenant des mêmes départements sont indol négatives. Nous avons même, d'une même vipère, isolé deux colonies de ce sérotype : l'une était indol +, l'autre indol —. Tous les autres caractères biochimiques étaient semblables, à part de légères variations dans la fermentation du lactose qui se produisait entre un et trois jours. La formule antigénique de ce sérotype peut être exprimée par la formule *Salmonella* 18 : z<sub>10</sub> : z.

7:27:38 (nouveau type [10]) : 3 souches provenant de 2 vipères originaires de Vendée et Loire-Atlantique. Toutes font fermenter le saccharose.

9:26:21 : 1 souche indologène.

9:33:31 (nouveau type [9]) : 42 souches provenant de 24 vipères.

Deux d'entre elles, provenant d'une même vipère capturée en Vendée produisent de l'indol. L'antigène O est identique à O : 50 de *Salmonella greenseide* et H<sub>33</sub> peu différent de i de *S. typhi murium*.

10a 10c : 1,2,5,6 (nouveau type [7]) : 2 souches isolées non de

vipères, mais de couleuvres. Elles cultivent sur milieu de Braun au CNK et n'acidifient pas les milieux lactosés. L'antigène O est presque identique à l'antigène O : 49 des *Salmonella*.

12 : 27 : 28 (nouveau type [8]) : ce sérotype est fréquent : nous en avons trouvé 83 souches provenant de 57 vipères. Le lactose est en général fermenté en un jour, parfois en deux ou trois jours au plus. Chez une même vipère nous avons trouvé des colonies lactose +<sup>1</sup>, d'autres lactose +<sup>3</sup>. Une souche était monophasique : 12 : 28 (lactose +<sup>1</sup>), une autre faisait fermenter le saccharose et une troisième était indologène. Ces souches peuvent être décrites par la formule *Salmonella* 17 : z<sub>10</sub> : e n...

16 : 24 : 31 : 12 souches provenant de 7 vipères. L'antigène O est identique à O : 38 des *Salmonella* et l'antigène H<sub>24</sub> voisin de r.

19 : 22 : 31 (nouveau type [7]) : 30 souches isolées de 16 vipères. Toutes sont indologènes. Six d'entre elles, provenant de 3 vipères, font en outre fermenter le saccharose.

20 : 24 : 21 (nouveau type [7]) : 4 souches, avec biochimie normale, isolées de 2 vipères. Pour 3 souches provenant d'un même animal, nous avons observé une acidification du lactose en un, deux et trois jours. L'antigène O : 20 est très voisin de l'antigène O : 35 des *Salmonella* et des antigènes 111 : B<sub>4</sub> des *E. coli*. L'antigène H<sub>21</sub> est peu différent du z<sub>35</sub> des *Salmonella*.

21 : 23 : 25 (nouveau type [9]) : 4 souches provenant de 3 vipères. Habituellement les souches de ce groupe O : 21 présentent l'anomalie biochimique de cultiver en présence de CNK [11], fait confirmé pour un nouveau sérotype originaire de Saïgon [10]. Or ces souches de France ont une biochimie normale. L'antigène H<sub>23</sub> est voisin du l z<sub>13</sub> des *Salmonella*.

25 : 23 : 21 : 6 souches isolées de 5 vipères (Maine-et-Loire et Vendée). Toutes sont indologènes.

25 : 23 : 30 (nouveau type [8]) : 16 souches provenant de 12 vipères. Deux d'entre elles, isolées de 2 vipères sont indologènes. Ce sérotype a des antigènes O et H identiques à ceux des *Salmonella* et il pourrait être décrit par la formule *Salmonella* 16 : l z<sub>13</sub> : 1,5.

26 : 33 : 25 (nouveau type [9]) : 32 souches provenant de 20 vipères. Le lactose, habituellement acidifié en un à deux jours, l'a été une fois en cinq jours.

28 : 23 : 25 (nouveau type [9]) : 16 souches provenant de 9 vipères. Quatre souches provenant de 2 vipères capturées dans deux départements éloignés l'un de l'autre (Gers et Maine-et-Loire) sont indologènes, alors que d'autres de même origine ne présentent pas cette anomalie. Tandis que le sorbitol est fermenté en un jour par toutes les autres *Arizona*, il ne l'est que tardivement (quatre à dix jours) par celles de ce sérotype. L'anti-



gène O : 28 est très voisin de l'antigène O : 47 des *Salmonella* (*S. kaolak*).

28 : 33 : 25 : 1 souche de biochimie normale.

L'analyse antigénique de 6 autres souches ayant des caractères biochimiques d'*Arizona* (une indol +) n'a pu être faite, ces souches n'étant plus viables au moment d'entreprendre cette étude.

#### SÉROTYPES DE *Salmonella*.

Cinq vipères hébergeaient des *Salmonella*, 4 capturées dans le Maine-et-Loire, une dans le Gers. Les 5 souches étaient des *S. paratyphi* B variété Java (D-tartrate positives). Trois d'entre elles ne possédaient pas l'antigène O : 5.

#### ASSOCIATIONS DE SÉROTYPES DIFFÉRENTS CHEZ UN MÊME ANIMAL.

Celles-ci sont assez nombreuses :

1,4 : 24 : 25 + 12 : 27 : 28 + 21 : 23 : 25  
 7 : 27 : 31 + 12 : 27 : 28 (3 fois)  
 7 : 27 : 31 + 25 : 23 : 21 + 28 : 23 : 25  
 7 : 27 : 31 + 9 : 33 : 31  
 9 : 26 : 21 + 12 : 27 : 28  
 9 : 33 : 31 + 28 : 23 : 25  
 9 : 33 : 31 + 28 : 23 : 25 + 12 : 27 : 28  
 9 : 33 : 31 + 16 : 24 : 31 + 19 : 22 : 31 (2 fois)  
 9 : 33 : 31 + 19 : 22 : 31 (2 fois)  
 9 : 33 : 31 + 12 : 27 : 28  
 9 : 33 : 31 + 26 : 23 : 25  
 10a 10c : 1,2,5,6 + 25 : 23 : 30  
 12 : 27 : 28 + 19 : 22 : 31 (3 fois)  
 12 : 27 : 28 + 21 : 23 : 25  
 12 : 27 : 28 + 25 : 23 : 30  
 12 : 27 : 28 + 20 : 24 : 21 + 25 : 23 : 30  
 12 : 27 : 28 + 26 : 33 : 25 (3 fois)  
 12 : 27 : 28 + 19 : 22 : 31 + 28 : 23 : 25  
 19 : 22 : 31 + 25 : 23 : 30  
 19 : 22 : 31 + 21 : 23 : 25  
 20 : 24 : 21 + 25 : 23 : 30  
 25 : 23 : 21 + *S. paratyphi* B Java  
 25 : 23 : 30 + 26 : 33 : 25

A côté d'Entérobactéries qui pouvaient être rattachées à un groupe connu, nous en avons trouvé certaines qui étaient difficilement classables. Nous en citerons deux exemples :

a) Mobile, CNK, LDC, adonitol, dulcitol, inositol, salicine, gélatine, VP et D-tartrate négatifs ; xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbose, sorbitol, lactose, maltose, saccharose, tréhalose, citrate, indol, H<sub>2</sub>S, RM positifs.

b) Mobile, CNK, LDC, xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, lactose, maltose, tréhalose, citrate, indol,  $\text{SH}_2$  et RM positifs ; adonitol, sorbose, saccharose, inositol, salicine, D-tartrate et VP négatifs.

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Cette enquête sur la présence d'Entérobactéries considérées comme pathogènes chez les vipères, nous a permis de faire les constatations suivantes, dont certaines étaient inattendues :

1° La fréquence des résultats positifs : 44,8 p. 100 des vipères hébergeaient des *Arizona*, des *Salmonella*, ou les deux à la fois. Cette fréquence a varié suivant les 6 départements où avaient été capturées les vipères, de 33 à 59 p. 100.

2° Sur 16 sérotypes rencontrés, 11 n'avaient encore jamais été décrits.

3° Les associations de plusieurs sérotypes différents chez un même animal ne sont pas rares : nous les avons rencontrées trente et une fois, soit chez 23 p. 100 des vipères hébergeant des *Salmonella* ou des *Arizona*.

4° Les *Salmonella* rencontrées appartenaient à un seul sérotype : *S. paratyphi* B variété Java. Tandis que 43,2 p. 100 des reptiles hébergeaient des *Arizona*, seulement 1,8 p. 100 étaient porteurs de *Salmonella*.

5° Les anomalies biochimiques chez ces *Arizona* sont particulièrement fréquentes. Classiquement ces bactéries sont indol et saccharose négatives, ne cultivent pas sur CNK. Or, sur 277 souches, 55, soit 20,8 p. 100, sont indologènes ; 10, soit 3,6 p. 100, font fermenter le saccharose. Nous n'avons rencontré que 3 souches, soit 1 p. 100, qui cultivaient en présence de CNK.

6° Si les souches de certains sérotypes sont toutes indologènes, on rencontre dans d'autres sérotypes des souches indol + et indol —. Nous avons même trouvé ces deux variantes dans des souches isolées d'une même vipère.

7° A part deux souches d'un même sérotype (10a 10c : 1,2,5,6) qui ne font pas fermenter le lactose, les *Arizona* qui font l'objet de cette note acidifient rapidement les milieux lactosés ; la plupart d'entre elles en vingt-quatre heures. Ceci est habituel chez les *Arizona* diphasiques, alors que les souches monophasiques ne font que tardivement virer les milieux lactosés.

8° Les observations ci-dessus, si elles contribuent à une meilleure connaissance du groupe *Arizona*, n'en simplifient pas la définition ; les caractères « indol et saccharose négatifs » [6] devraient être considérés comme « variables ».

## RÉSUMÉ.

Les cultures d'urine et de selles de 310 vipères, capturées en France et adressées à l'Institut Pasteur pour la collecte du venin, ont permis d'isoler chez 5 animaux (1,8 p. 100) *S. paratyphi* B var. *java* (*Salmonella java*) et chez 134 (43,2 p. 100) des bactéries du groupe *Arizona*; 277 cultures d'*Arizona* ont été étudiées. Elles appartenaient à 16 sérotypes différents, dont 11 n'avaient pas encore été décrits. Chez 30 animaux au moins deux sérotypes différents d'*Arizona* étaient présents simultanément et chez l'un une *Arizona* était associée à *S. java*.

Beaucoup de ces *Arizona* faisaient fermenter le lactose en vingt-quatre heures avec production de gaz. Tandis que les *Arizona* ne produisent normalement pas d'indol, ne font pas fermenter le saccharose et ne cultivent pas en milieu au CNK, 55 de nos cultures (20,8 p. 100) produisaient de l'indol, 10 (3,6 p. 100) faisaient fermenter le saccharose et 3 (1,0 p. 100) cultivaient en milieu au CNK.

## SUMMARY

STUDIES ON *Salmonella* AND *Arizona*  
ISOLATED FROM SNAKES IN FRANCE.

In the examination of the feces and urine of 310 native venomous snakes of France sent to Institut Pasteur for the collection of venom, *Salmonella paratyphi* B var. *java* (*Salmonella java*) was found in five reptiles (1,8 p. 100) while organisms of the *Arizona* group were found in 134 (43,2 p. 100). In all, 277 *Arizona* cultures were examined and found to belong to 16 different serotypes, of which 11 had not been recognized prior to the beginning of the study. In 30 of the snakes, two or more *Arizona* serotypes were found simultaneously and in one an *Arizona* strain was associated with *S. java*.

Attention is called to the fact that many of these *Arizona* strains fermented lactose with production of gas within 24 hours. While *Arizona* strains ordinarily do not produce indol, ferment sucrose, or grow in CNK medium, it was found that 55 cultures (20,8 p. 100) produced indol, 10 (3,6 p. 100) fermented sucrose, and 3 (1,0 p. 100) grew in CNK medium.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROLAND (F.), BOURBON (D.) et SZTURM (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 914.
- [2] THIBAULT (P.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 551.
- [3] CARLQUIST (P. R.). *J. Bact.*, 1956, **74**, 339.

- [4] KOHN (J.). *J. clin. Path.*, 1953, **6**, 249.
  - [5] LAUTROP (H.). *Acta. path. microb. scand.*, 1956, **39**, 357.
  - [6] *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1958, **8**, 25.
  - [7] EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 782.
  - [8] EDWARDS (P. R.), LE MINOR (L.) et MAC WHORTER. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 791.
  - [9] LE MINOR (L.), EDWARDS (P. R.) et FIFE (M. A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 685.
  - [10] FIFE (M. A.), LE MINOR (L.), EDWARDS (P. R.) et CHAMBON (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 236.
  - [11] EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.) et EWING (W. H.). *Am. J. med. Techn.*, 1956, **22**, 28.
-

## MISE AU POINT : BACILLE DE WHITMORE ET MÉLIOÏDOSES

par L. LAPEYSSONNIE (\*).

(Larobatoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine  
de Montpellier.)

### POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

Ordre : Bactériales ; Famille : *Parvobacteriaceae* ; Genre : *Malleomyces* ; Espèce : *Malleomyces-pseudo mallei* ou bacille de Whitmore.

Répond à la définition : bacilles courts ou filamenteux, Gram-négatifs, mobiles, pathogènes pour l'homme et les animaux.

Le bacille de Whitmore a été considéré pendant longtemps comme ayant son principal réservoir parmi les muridés domestiques de l'Extrême-Orient, chez qui il détermine, souvent sur le mode épizootique, une affection aiguë des voies respiratoires supérieures (jetage purulent) et s'étendant secondairement à tout le poumon (hépatisation, dyspnée, mort).

A côté des ces manifestations aiguës, il existe chez les rats (*R. alexandrinus*, *R. norvegicus*) une forme d'évolution chronique, apparaissant par cas sporadiques sur un fonds d'endémicité, et se traduisant par des abcès sous-cutanés et profonds et dans le pus desquels Fletcher et Stanton, pour la première fois en 1913, isolèrent un bacille Gram-négatif et mobile.

L'année précédente, le médecin-colonel Whitmore eut l'occasion de soigner, à Rangoon, où il était en poste, des coolies assez misérables qui se présentaient au dispensaire avec de vastes abcès sous-cutanés, souvent fistulisés, d'où s'écoulait un pus doré (d'où le terme de mélioïdose, de melis, miel) ; il découvrit rapidement l'origine de ces suppurations ; ces coolies, morphinomanes, se faisaient injecter la drogue, d'ailleurs assez grossièrement préparée, par des apothicaires locaux, qui utilisaient des seringues rudimentaires en fer-blanc, sans aiguilles, l'extrémité pointue et aiguisée en faisant fonction, et, bien entendu, non stérilisées ; Whitmore trouva dans le pus de ces abcès un bacille mobile,

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mai 1958.



Gram-négatif et, en 1921, au IV<sup>e</sup> Congrès de Médecine tropicale, à Batavia, on conclut à l'identité de ce germe avec celui trouvé par Fletcher chez les rats et l'épidémiologie fit jouer un rôle important au rat comme conservateur et disperseur du germe par ses urines, ses déjections, le pus de ses abcès, souillant le milieu extérieur, les aliments, les objets et notamment les fameuses seringues !

Le territoire nosographique du bacille de Whitmore, comme on l'appelait maintenant, ne tarda d'ailleurs pas à s'étendre chez l'homme et on décrivit à côté de ces suppurations sous-cutanées, musculaires et osseuses à long terme, des formes aiguës septicémiques ou spetico-pyohémiques pouvant en imposer cliniquement pour une typhoïde, une rickettsiose, voire la peste ou le choléra ; l'homme, comme le rat, peut également présenter une localisation pulmonaire, aiguë ou subaiguë, dont l'aspect clinique et les images radiologiques sont ceux d'une « fausse tuberculose », fausse car l'on ne trouve jamais de B. K. dans l'expectoration.

Tous les organes et tous les tissus peuvent être atteints par le bacille de Whitmore : hépatites aiguës avec ou sans ictère, tractus digestif avec des gastro-entérites aiguës, cholériformes, péritonites suppurées primitives, néphrites subaiguës, pleurésies purulentes d'évolution trainante ; lorsque le névraxe est atteint, le pronostic, déjà grave dans les autres formes, devient ici fatal.

Alain, Saint-Etienne et Reynes notent que, dans 75 p. 100 des cas, la mélioi-dose apparaît chez des sujets en état de défaillance passagère (opérés récents : trois à cinq jours après l'intervention), ou compliquant une affection préexistante (pneumococcie, cirrhose, tabès, tuberculose, paludisme viscéral évolutif, leptospirose, voire la coqueluche ou la colibacillose), faisant ainsi jouer un rôle important au facteur *terrain*.

Une première réflexion se présente à l'esprit devant ces cas apparus en milieu hospitalier, donc en des lieux où la contamination directe par les rats est la moins à redouter ; une deuxième constatation vient encore compliquer le problème : ce sont les Européens, dont l'hygiène est cependant infiniment meilleure que celle des Asiatiques, qui, en Indochine, à l'inverse de ce qui se passe pour la peste, sont plus atteints que les Viet-Namiens, pourtant en contact étroit avec les rats ; donc, facteur *racial* non négligeable.

A côté du rôle indubitable dévolu aux rongeurs, il fallait donc chercher un deuxième mode de contamination susceptible de satisfaire les exigences cliniques et surtout épidémiologiques. La présence d'un Corps expéditionnaire français de 1944 à 1955 dans la péninsule indochinoise, l'apparition de cas de mélioi-dose survenant parmi des militaires européens, nord-africains et noirs, au

contact journalier des eaux stagnantes et des boues, fit rapidement conclure que la contamination pouvait se faire aussi par le milieu extérieur, sans faire intervenir les muridés ; notons au passage que sur 20 000 rats capturés et autopsiés en Indochine, Reynes n'isole (1949) qu'une seule souche de *M. pseudomallei*.

Cette idée du milieu extérieur, réservoir de virus et cause de contamination, n'était cependant pas nouvelle ; Vaucel l'avait déjà pressentie vers 1925 lorsqu'il signala plusieurs cas de mélioïdose apparus après accidents de la route et bains forcés dans des mares ou arroyos. Poussant plus loin la recherche, il immergea dans l'eau d'une mare un cobaye préalablement épilé et isola par ce moyen une souche de *M. pseudomallei* en même temps qu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette expérience ne fut pas, pendant longtemps, reconnue à sa vraie valeur ; on objecta que le cobaye était placé dans des conditions « artificielles » ; pas plus cependant qu'un travailleur des rizières ou un soldat aux multiples excoriations cutanées, parfois blessé.

Curieusement, cette association avec *Ps. aeruginosa*, si banal pourtant dans le milieu extérieur, fut à l'origine d'une hypothèse séduisante, mais sans fondement biologique certain, qui voulait faire de *M. pseudomallei* un « mutant » ou une « variété » de *Ps. aeruginosa*. On faisait observer que :

1° Les deux germes sont mobiles et Gram —.

2° Qu'ils ont quelque parenté biochimique (d'ailleurs assez banale).

3° Qu'il existe des variétés achromogènes de *Ps. aeruginosa* et qu'à la longue *M. pseudomallei* est susceptible d'élaborer un pigment brun.

4° On minimisait la parenté avec *M. mallei* parce que celui-ci est immobile ; quant à la fraction antigénique commune aux deux espèces, on la négligeait sous prétexte que des fractions antigéniques communes existent entre des germes pourtant éloignés (*rickettsies* et *Proteus*, staphylocoques et *perfringens*, etc.).

5° Surtout on mettait en avant une série de faits exacts ; à savoir : le caractère pathogène certain de *Ps. aeruginosa* en Extrême-Orient, et le fait que le bacille pyocyanique est souvent rencontré associé chez le même malade avec le bacille de Whitmore ; on citait les observations de plusieurs hémocultures successives, positives à *Ps. aeruginosa*, puis finalement positives à *M. pseudomallei*.

C'était oublier l'existence des associations microbiennes et le comportement différent des germes dans l'organisme humain, en particulier les délais d'invasion propres à chaque espèce bactérienne.

Cette hypothèse doit, à notre avis, être abandonnée, pour intéressante qu'elle soit, devant les faits nouveaux apportés ces dernières années par les chercheurs travaillant au Vietnam et, en particulier, devant les observations de Chambon et de ses collaborateurs à l'Institut Pasteur de Saïgon et de Leclerc et Sureau à l'Institut Pasteur d'Hanoï.

Rappelant la rusticité de ce germe « mésotrophe » qu'est *M. pseudomallei*, puisqu'il cultive dans l'eau du robinet à 30°, est capable de survivre quarante-quatre jours dans l'eau, vingt-sept jours dans la poussière à 27°, Chambon pose en principe qu'un tel germe *doit nécessairement* se trouver dans le milieu extérieur. Il le démontre en 1955 en ensemençant de la terre et de la boue ainsi que des eaux en milieu de Lévine et en repiquant les colonies suspectes ; il isole ainsi, sur 150 prélèvements, 12 souches de bacille de Whitmore, dont 7 sont *authentiquement pathogènes pour le cobaye* et les 5 autres montrent à la fois les caractères biochimiques et culturels du bacille de Whitmore associés à l'agglutinabilité par le sérum anti-Whitmore. Fait remarquable, ces souches proviennent toutes de boues et d'eaux stagnantes ; la terre des jardins, l'eau courante ne contiennent pas de *M. pseudomallei*.

Leclerc et Sureau, en 1956, appliquant au même problème la technique générale de Guelin et Buttiaux, mettent en évidence dans les eaux stagnantes d'Hanoï et de ses alentours *des bactériophages anti-Whitmore*. Cette méthode extrêmement élégante, qui consiste à rechercher dans les eaux le « phage » spécifique des germes responsables d'épidémies d'origine hydrique (typhoïde, choléra), ou de témoins de la contamination fécale (*E. coli*), permet de mettre en évidence par un procédé indirect des germes que l'on ne trouve pratiquement jamais dans l'eau contaminée, et de le faire à peu de frais et rapidement.

Sans entrer dans les détails, il ressort des observations de Leclerc et Sureau que :

1° Trente eaux sur 152 examinées contiennent du bactériophage anti-Whitmore (20 p. 100).

2° Ces « phages » sont actifs vis-à-vis de toutes les souches du Nord-Vietnam de bacille de Whitmore ; ils sont actifs sur 60 p. 100 des souches du Sud-Vietnam, ce qui laisse à penser qu'il existe *au moins* deux types phagiques différents correspondant à deux souches antigéniquement distinctes de *M. pseudomallei*, ce qui expliquerait les difficultés actuelles du diagnostic sérologique des mélioiïdoses ; il est intéressant de noter que la souche C. 141 qui sert à la préparation des divers antigènes pour le diagnostic de la mélioiïdose à l'Institut Pasteur de Saïgon *n'est pas lysée* par les bactériophages de Hanoï.

3° Ces « phages » sont inactifs vis-à-vis de 25 souches d'*Achromobacter*, 10 souches de *Flavobacterium* et 8 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui permet d'envisager sur des bases solides l'authenticité et la personnalité bactériologique du bacille de Whitmore et son absence de parenté antigénique avec des germes, y compris *Ps. aeruginosa*, que l'on considérerait comme des espèces voisines, d'où *M. pseudomallei* aurait pu provenir par mutation.

Le problème épidémiologique est donc plus clair actuellement : il y a deux sources de contamination : les muridés et les eaux stagnantes et boues ; il n'est pas possible pour le moment de préciser l'importance relative des deux réservoirs de virus, pas plus que leur interdépendance ; l'homme s'infecte accidentellement à ces deux sources, soit directement par ses occupations (rizières, opérations militaires), soit par contact avec les rats et leurs déjections. Il est probable que des circonstances secondaires, surmenage, choc opératoire, maladie préexistante, race, constituent des *facteurs de révélation* d'une infection jusque-là latente.

Pour en terminer avec ce chapitre de l'épidémiologie, signalons que d'après Nguyen-Ba-Luong, la mélioïdose serait susceptible d'une évasion hors de l'Extrême-Orient sur le plan vétérinaire ; des cas suspects auraient été signalés chez l'homme en Ouganda par Duke ; en tout cas Girard, à Madagascar, a signalé la présence de *M. pseudomallei* chez le porc ; sommes-nous ici en face d'une de ces maladies d'avenir à l'aube de leur existence épidémiologique et qui pourraient faire leur apparition en Europe à la faveur du déclin actuel des maladies infectieuses traditionnelles ?

C'est en faisant nôtre cette hypothèse que nous estimons devoir donner quelques informations sur l'agent pathogène et son diagnostic au laboratoire.

L'AGENT PATHOGÈNE. — Bacille droit de 5  $\mu$  de long sur 1  $\mu$  de large, *mobile* (cils). Pas de capsule ni de spores (mais pseudo-capsules ou enveloppes [Chambon]). Gram — (parfois coloration bipolaire). Germe mésotrophe ; synthétise tous les métabolites essentiels.

CULTURES. — Pousse bien sur milieux ordinaires.

Les cultures sont caractéristiques :

a) En B. O. : Voile plissé en quarante-huit heures, très particulier (quadrillé). Odeur de « truffe » des vieilles cultures. Le bouillon brunit en quelques jours.

b) En G. O. : Dissociation spontanée et immédiate ; colonies S, mucoides, grosses, blanches, reflet « plombé » ; colonies R, sèches, grises, plissées en « chapeau chinois » (Suchard) ; coagule le lait ; liquéfie gélatine et sérum coagulé.

c) P. de terre : enduit brun chocolat (comme *M. mallei*).

Attaque : glucose, saccharose, lactose, maltose, mannite, dulcité, dextrine ; sans gaz ; VP : négative ; MR : négative ; Indole : négative ; SH<sub>2</sub> : variable.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL AVEC *M. mallei* PAR LES CULTURES : Voile, dissociation spontanée S — R, coagule le lait (protéolytique). *Test de Braun* : positif après quatre jours ; négatif avec *M. mallei* ; positif en vingt-quatre heures avec *Ps. aeruginosa*.

INOCULATIONS. — Animaux de choix : cobaye et lapin (le rat donne assez souvent des formes chroniques) ; les cultures anciennes perdent généralement leur virulence pour l'animal.

Voie sous-cutanée : maladie locale (abcès et ganglion) qui se généralise : satellite ; tubercules dans la rate et le foie dont le diagnostic est difficile d'avec ceux de *M. mallei* et *Cillopasteurella*.

Voie intrapéritonéale : vaginalite suppurée chez le mâle.

Voie percutanée : sur peau épilée, pour produits septiques, comme les crachats et pièces nécropsiques.

IMMUNOLOGIE. — Pas d'exotoxine. Une endotoxine, thermostable, utilisée sous forme de « whitmorine », analogue à la malleïne pour le diagnostic des formes animales.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE. — a) Un antigène d'enveloppe, responsable de la formation de « pseudo-capsules » ou « enveloppes » (Chambon), semblable à l'antigène Vi des salmonelles ; responsable de l'O-inagglutinabilité, qui disparaît par chauffage de la suspension microbienne ; b) Un antigène O somatique ; c) Un antigène H flagellaire répondant aux données classiques.

DIAGNOSTIC DES MÉLIOIDOSES AU LABORATOIRE. — *En zone endémique la mélioïdose est une affection « plus méconnue que rare »*. En 1932, Stanton et Fletcher signalent que le diagnostic clinique n'a été porté que huit fois sur 83 souches isolées, à cause de la grande variété des aspects cliniques et de l'absence d'un traitement d'épreuve qui soit spécifique (comme l'émétine dans l'amibiase, par exemple).

La mise en évidence directe du germe, par hémoculture ou par ensemencement de produits pathologiques variés (crachats, urines, etc.), ou par inoculation au cobaye, est intéressante parce qu'elle apporte la *certitude étiologique* et fournit des données sur la *sensibilité du germe aux divers antibiotiques*.

De 54 souches isolées à Saigon par Fournier, Lajudie et



Chambon en 1953, la provenance se répartissait ainsi : 21 hémocultures ; 8 crachats ; 8 liquides pleuraux ; 1 urine ; 8 pus d'abcès ; 2 L. C.-R. ; 2 liquides articulaires ; 4 prélèvements nécropsiques.

Il faut savoir que :

a) L'hémoculture peut être négative même si l'inoculation est positive, même si *post mortem* on finit par isoler le germe.

b) L'on doit donc répéter les hémocultures, les associer aux autres cultures (crachats tout particulièrement ; Cros et Brygoo en ont montré l'intérêt), les compléter par l'inoculation au cobaye.

c) La technique est la technique banale ; les milieux sont les milieux ordinaires ; le diagnostic du germe est facile : morphologie, mobilité, voile en milieux liquides, dissociation spontanée des colonies sur gélose ordinaire, agglutination par sérum anti-Whitmore en sont les étapes, simples, si l'on pense à ce germe. On doit les compléter par l'inoculation de la souche au cobaye et au lapin qui doivent présenter une septicémie mortelle avec métastases polyviscérales, où l'on retrouve en abondance le bacille de Whitmore.

LES PROCÉDÉS INDIRECTS. — Sur le sérum du malade ou convalescent.

1° *Séro-agglutination* avec des cultures de 24 heures de la souche C 141. Technique ordinaire. Résultats : peu sensibles, 4 p. 100 de fausses réactions positives, surtout avec salmonelles et rickettsies.

2° *Hémagglutination*, type Middlebrook-Dubos, utilisant un antigène trichloracétique de *M. pseudomallei* pour sensibiliser les hématies O Rh —. Technique ordinaire. Résultats : plus sensibles et plus précoces, mais toujours 3 p. 100 de réponse aspécifiques.

3° *Fixation du complément*. On utilise le même antigène que pour l'hémagglutination. Technique ordinaire de Kolmer. Résultats : à peu près semblables à ceux des deux techniques précédentes.

#### CLASSEMENT.

SENSIBILITÉ	SPÉCIFICITÉ
—	—
1 Hémagglutination.	1 Hémagglutination.
2 Fix. du complément.	2 Agglutination.
3 Agglutination.	3 Fix. du complément.

Associer 2 sinon 3 des techniques et exiger des titres élevés : 1/80 pour le séro-diagnostic ; 1/4 pour l'hémagglutination.

4° *L'I. D.-R.* La whitmorine est un extrait filtré d'une culture sur bouillon glyciné de 5 semaines de bacille de Whitmore. Elle présente un intérêt chez l'animal, mais donne une réaction croisée avec la malléine, provoque une réaction dermo-nécrosante très forte de type allergique. Chez l'homme on ne l'utilise pas ; les extraits trichloracétiques de type Boivin donnent des réactions difficiles à interpréter et ont peu d'intérêt diagnostique.

#### RÉSUMÉ.

Le bacille de Whitmore (*Malleomyces pseudomallei*), trouvé à peu près simultanément en Extrême-Orient chez l'homme et chez le rat, a vu au cours des quarante dernières années son pouvoir pathogène se diversifier et s'étendre considérablement (suppurations diverses, formes aiguës septicémiques, localisations pulmonaires et pleurales, nerveuses, hépatiques, etc.) et le nombre des cas augmenter, parce que l'affection est maintenant mieux connue sur le plan clinique et parce que des méthodes de laboratoire (isolement des souches, séro-agglutination, hémagglutination, réaction de fixation du complément) sont entrées dans la pratique.

Sur le plan épidémiologique, il apparaît maintenant comme démontré que le bacille de Whitmore existe normalement dans les boues et les eaux stagnantes du Vietnam qui constituent le principal réservoir de virus ; il y a été trouvé soit directement, soit indirectement par la mise en évidence de bactériophages anti-Whitmore.

En outre, de ces recherches récentes on peut conclure que le bacille de Whitmore est un germe bien individualisé et non un mutant d'espèces voisines.

L'aire actuelle de répartition du germe, limitée à l'Extrême-Orient, n'est vraisemblablement que provisoire.

#### SUMMARY

##### WHITMORE BACILLUS AND MELIOIDOSIS, A SURVEY.

*Bacillus whitmori* (*Malleomyces pseudomallei*) has been found almost simultaneously in human beings and in rats in the Far East. In the last forty years, its pathological range has become much broader (different suppurations, acute septicemic forms, pulmonary, pleural, nervous, hepatic localizations), and the number of cases has increased. This is due to the facts that the disease is now better known clinically, and that laboratory methods (isolation of strains, sero-agglutination, hemagglutination, complement fixation reaction) are now commonly used.

From the epidemiological viewpoint, it is now proved that *M. pseudomallei* normally exists in sludges and stagnant waters, which represent the main source of the virus in Vietnam. It has been found in these sludges and waters either directly or indirectly by the demonstration of anti-Whitmore bacteriophages.

Furthermore, the recent findings show that the Whitmore bacillus is a well characterized germ, and not a mutant of other species.

The present geographical distribution of the germ, which is till now limited to the Far East, will probably extend much farther.

#### BIBLIOGRAPHIE RÉCENTE

- AMOUROUX (J.). *Le Poumon*, 1952, **4**, 449.  
 BLANC (G.). *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 1947, Cahier 3, p. 520.  
 BLANC (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **58**, 281.  
 BONNIN (J.). *J. Méd. Bordeaux*, 1951, **1**, 273.  
 BRYGOO (E. R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 347.  
 BRYGOO (E. R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 169.  
 BRYGOO (E. R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, **45**, 62.  
 CHAMBON (L.) et coll. *Inst. Pasteur Vietnam. Rapport annuel*, 1955, **89**, 13.  
 COLLOMB (H.). *Revue Méd. Chir. F. A. E. O.*, 1953, **1**, 73.  
 CROS. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 217.  
 DESPUJOLS (B.) et coll. *Méd. trop.*, 1942, **2**, 689.  
 DUROUX (R.). *Bull. Soc. Hôp. Paris*, 1952, **28-29**, 1061.  
 DUROUX (R.). *Revue Prat.*, 1953, **25**, 1179.  
 DUROUX (R.). *Sem. Hôp. Paris*, 1953, n° 23, 1160.  
 DUNLOP. *Trop. Dis. Bull.*, 1953, **5**, 452.  
 FARINAUD. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1950, **48**, 720.  
 FORT. *Bull. Inf. Santé*, 1952, **1**, 297.  
 FOURNIER (J.). *Méd. trop.*, 1953, **13**, 683.  
 GARRY. *J. Lab. et Clin. Méd.*, 1951, **38**, 374.  
 HUARD (P.). *Sem. Hôp.*, 1957, n° 4, 173.  
 LAJUDIE (P. DE). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, **45**, 45.  
 LAJUDIE (P. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **1**, 112.  
 LAJUDIE (P. DE). *Ann. Biol. clin.*, 1953, **2**, 616.  
 LAJUDIE (P. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 509.  
 LECLERC (H.) et coll. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1956, **49**, 874.  
 NGUYEN VAN AI et coll. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1957, **50**, 11.  
 ODERR (C. P.) et coll. *Am. J. Roentg.*, 1956, **76**, 94.  
 RAFFALI. *Revue Prat.*, 1956, **6**, 1799.  
 SAINT-ÉTIENNE (A.) et REYNES (V.). *Méd. trop.*, 1949, **9**, 119.  
 SUTMOLLER (P.) et coll. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 1957, **130**, 415.

**LA NUMÉRATION DES GERMES TELLURIQUES  
PAR VOIE BIOLOGIQUE.  
UNE NOUVELLE MÉTHODE D'APPRÉCIATION :  
LA NUMÉRATION CINÉTIQUE.**

**I. — EXPOSÉ GÉNÉRAL**

par J. AUGIER et D. LAVERGNE (\*).

*(Institut Pasteur, Paris)*

Dans une note antérieure [1] l'un de nous a précisé les conditions dans lesquelles il est possible de dénombrer les germes d'un sol à l'aide de la microscopie en fluorescence. Il a montré que cette méthode est une bonne technique de référence à condition de faire les dilutions de terre en pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000, dispersant déjà utilisé à un autre sujet par Dommergues [2]. Si cette méthode donne, en effet, une très bonne dispersion des germes et une bonne visibilité, il n'en reste pas moins qu'elle est fatigante et nécessite une certaine habitude ; c'est pourquoi nous n'avons pas abandonné nos recherches sur la possibilité de dénombrer les germes telluriques par voie biologique.

Nous allons voir que la méthode que nous proposons est encore imparfaite, puisqu'elle ne dénombre qu'environ 10 p. 100 des germes totaux, mais qu'elle nous laisse espérer atteindre le même résultat qu'en microscopie directe dans un proche avenir ; nos recherches à ce sujet ne sont pas terminées. Nous donnons ici, dans trois notes successives, l'exposé général de notre méthode, son étude statistique et l'interprétation biologique des résultats par rapport à différentes terres.

Les méthodes biologiques de numération utilisent des milieux de culture solides ou liquidesensemencés à l'aide de dilutions-suspensions de terre. Les problèmes à résoudre sont donc de trois ordres :

1° Le choix du milieu de culture ;

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 juin 1958.

2° La manière d'effectuer les dilutions ;

3° L'estimation de la précision d'où découle le plan expérimental à étudier.

# I. — CHOIX DU MILIEU.

Qu'il s'agisse de milieux solides ou liquides, la meilleure source alimentaire est l'extrait de terre [3]. Cet extrait est préparé comme suit :

Choisir un sol de jardin de pH 7 à 7,5, pas trop argileux, ayant reçu du terreau à base de feuilles ou de paille (c'est-à-dire les terres voisines des mulls neutres). En prélever 10 kg dans la zone des 15 à 30 cm de profondeur. Les mettre dans un récipient métallique émaillé de 30 l et ajouter 10 l d'eau de rivière ou de puits. Couvrir avec un couvercle et laisser macérer vingt-quatre heures à la température du laboratoire. Porter à l'autoclave à 130-135° pendant une heure, puis laisser descendre la pression jusque vers 1 kg. Faire alors baisser assez rapidement la pression en laissant s'échapper la vapeur (pour éviter la caramélisation). Filtrer à chaud sur filtre de papier dur (deux filtres l'un dans l'autre). La filtration étant très lente, la répartir entre plusieurs récipients filtrant simultanément. Remplir les filtres au maximum et repasser sur le même filtre jusqu'à ce que le filtrat obtenu soit très clair. Rendement, 7 à 8 l. Le stockage de ce milieu est possible après répartition en fioles ou en tubes, puis stérilisation à 115°, trente minutes. Ces chauffages successifs sont sans grands inconvénients.

Il reste à choisir entre l'extrait de terre gélosé ou l'extrait tel quel. Ce problème a déjà été examiné [4] et c'est le milieu liquide à l'extrait de terre qui s'est montré le plus sensible (environ deux à trois fois plus). C'est donc avec un milieu à base d'extrait de terre que nous avons travaillé. Voici la manière de préparer ce milieu :

Stérliser à l'autoclave de l'eau de rivière ou de puits à 120-130° pendant trente minutes. Laisser au repos un à deux jours, puis filtrer pour éliminer le précipité qui s'est formé. Avec cette eau et l'extrait de terre préparé comme ci-dessus, réaliser le mélange suivant :

Extrait de terre .....	700 ml
Eau autoclavée .....	300 ml

Répartir ce mélange après une dernière filtration très soignée à raison de 5 ml par tube de 22 mm ; stériliser à 115° pendant vingt à trente minutes.



## II. — MANIÈRE D'EFFECTUER LES DILUTIONS.

La manière d'effectuer le broyage au mortier de la terre et de réaliser les dilutions a été indiquée dans une note précédente [5]. Précisons seulement que les deux ou trois premières dilutions sont faites en pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 et les suivantes en eau distillée, ce qui permet d'obtenir, comme nous l'avons montré, des dilutions beaucoup plus homogènes, seules valables pour la numération des germes telluriques en milieu liquide. Le taux de dilution et le nombre de tubesensemencés à chaque dilution sont discutés plus loin.

## III. — ESTIMATION DE LA PRÉCISION DES RÉSULTATS.

1° MODE OPÉRATOIRE GÉNÉRAL DES NUMÉRATIONS EN MILIEU LIQUIDE. — Faire des dilutions logarithmiques de raison  $a$ , à partir de suspension de terre déjà diluée à la dilution  $10^d$ . Ensemencer à partir de ces dilutions  $n$  tubes par dilution dans des tubes de 22 contenant 5 ml du milieu à base d'extrait de terre précédemment décrit. Onensemencera chaque tube avec un volume d'ensemencement  $v$ , le plus souvent 1 ml. On porte à l'étuve à  $28^\circ$  et on note au bout du temps  $t$  le nombre de tubes positifs à chaque dilution. Le calcul du nombre de germes  $N$  se fait de la manière suivante : à partir de la dilution origine  $10^d$  comprise on totalise pour cette dilution et les suivantes le nombre de tubes positifs, soit  $T$  ce total. On calculera le niveau moyen atteint désigné par  $Nm_a$  en faisant le rapport :

$$Nm_a = \frac{T}{n}$$

En utilisant les tables de Fisher [6] établies en fonction de  $Nm_a$  et du nombre  $S$  de dilutions comportant des tubes positifs depuis la dilution origine comprise, on détermine le logarithme du nombre de germes  $\lambda$  contenus dans la dilution prise pour origine dans le calcul ci-dessus, c'est-à-dire la dilution  $10^d$ . Si  $N$  est le nombre de germes contenus dans 1 g de terre on a :

$$\text{Log. } N = -\log. d + \log. \lambda.$$

d'où on tire la valeur de  $N$  (dans le cas où  $v = 1$  ml, sinon tenir compte de ce volume).

Les raisons du choix de ce calcul seront indiquées ailleurs [8].

2° PRÉCISION DE CE MODE DE NUMÉRATION. — La précision d'une mesure représentant la moyenne d'un ensemble de résultats dépend de la variance de cette moyenne. Dans le cas qui nous

occupe la variance de  $\log. \lambda$  est  $\frac{1}{n} \log. 2 \cdot \log. a$  et l'erreur commise sur  $\log. \lambda$  pour la probabilité  $p = 0,05$  est :

$$\Delta = \pm 1,960 \sqrt{\frac{1}{n} \log. 2 \cdot \log. a.}$$

Nous voyons donc que la précision des mesures est proportionnelle à  $\sqrt{n}$ . Pour obtenir, par exemple, une précision de  $\pm 0,1$  sur  $\log. \lambda$  il faut employer 30 tubes par dilution et effectuer des dilutions de raison 2. C'est un travail impraticable, qui ne peut constituer une méthode valable. Essayons cependant d'analyser plus à fond le problème.

3° VALEUR A DONNER A  $n$ . — Il est évident qu'il arrivera rapidement un moment où il n'y aura plus d'intérêt à augmenter  $n$ , la somme de travail étant directement proportionnelle à  $n$ , tandis que la précision n'augmente que proportionnellement à  $\sqrt{n}$ .

Mais quelles limites choisir ? Nous allons voir que la meilleure valeur de  $n$  est de 8 à 12 dans le cas général ; dans une note suivante nous analyserons les cas où il y a intérêt à dépasser ces chiffres. En pratique courante, on prendra 10 tubes par dilution, ce qui simplifie les calculs ultérieurs.

Du point de vue du travail, 12 paraît être un maximum au-dessus duquel le bénéfice devient le plus souvent illusoire par rapport à l'effort fourni.

Du point de vue de l'efficacité, ce chiffre ne peut guère dépasser 20 à 30. En effet, si on augmente beaucoup le nombre de tubes on arrivera à connaître avec une grande exactitude le nombre de germes contenus dans chacun des tubes de la dilution faite pour l'ensemencement, mais cette dilution est unique et sa répartition se fait au hasard avec sa variance propre. Donc, même dans le cas d'un grand nombre de tubes, la précision ne serait pas absolue. Il vaut mieux faire, par exemple, 10 tubes par dilution et répéter plusieurs fois toute l'expérience.

Mais quel minimum prendre ? Les statisticiens sont d'accord pour dire que 5 est un minimum au-dessous duquel les calculs statistiques perdent beaucoup de leur valeur. 10 paraît être un nombre satisfaisant. Il nous a semblé, en contrôlant par l'expérience, qu'il était difficile de descendre au-dessous de 8 et qu'on ne gagnait plus grand-chose au-dessus de 12 (sauf cas particulier) qu'au prix d'un travail disproportionné.

4° VALEUR A DONNER A  $a$ . — De toute évidence, des dilutions trop espacées risquent de dépasser la zone de dispersion des

résultats et, par suite, ne rien mesurer du tout. On ne peut mesurer 10 cm avec un règle non graduée de 1 m. Il y a donc certainement une valeur maximum à donner à  $a$ . Si  $a = 10$  (dilution de 10 en 10) la numération est-elle possible ? L'expérience montre qu'avec cet écart de dilution on a assez souvent le résultat suivant : tous les tubes positifs à une certaine dilution et aucun tube positif à la dilution suivante. Ce résultat n'est pas interprétable statistiquement. Les dilutions de 10 en 10 sont donc à abandonner.

On a le choix entre des dilutions de 2 en 2 ou de 4 en 4. Ici le calcul [7] et l'expérience montrent qu'il n'y a pas avantage à employer l'une plutôt que l'autre, du moment que le nombre total de tubesensemencés est le même dans les deux cas. C'est donc la position la plus économique du point de vue travail qui devra primer. Il semble plus économique d'ensemencer un plus grand nombre de tubes par dilution et d'avoir à faire moins de dilutions. Ce sont les dilutions de 4 en 4 qui seront choisies.

Nous arrivons alors à la situation suivante : dilutions de 4 en 4, et 8 à 10 tubes par dilution (12 si l'on veut un peu plus de précision).

Quelle en est la précision ? Toute cette étude serait bien décevante si nous n'avions un moyen de l'améliorer, car elle n'est que de  $\pm 0,3$  sur le logarithme de  $N$  et pour la probabilité  $p = 0,05$ . La méthode que nous proposons pour augmenter la précision est basée sur la dynamique de la numération.

#### IV. — LA NUMÉRATION CINÉTIQUE.

On procède à plusieurs lectures de numération en milieu liquide (faites comme plus haut), les troisième, quatrième, cinquième, sixième, huitième, dixième, treizième et vingtième jours.

Au bout de chacun de ces temps (que nous désignons par  $t$ ) on détermine la valeur du niveau moyen  $N_{m_a}$  atteint à l'aide de la formule :

$$N_{m_a} = \frac{T}{n} \quad (\text{voir plus haut}).$$

Il nous a paru plus commode de convertir ce résultat, qui est un logarithme à base  $a$ , en un logarithme à base 10 et de calculer tout de suite sa valeur comme si les dilutions avaient été faites à partir de 1 g de terre. Pour cela on applique la formule :

$$N_{m_{10}} = (N_{m_a} \cdot \log. a) - d \quad (1)$$

(1) Nous rappelons que la valeur numérique de  $d$  est un nombre négatif.

$d$  étant le log. de la dilution à base 10 qui a servi de point de départ aux dilutions à base  $a$ .

Exemple : soit 37 tubes positifs parmi les tubesensemencés à l'aide de dilutions faites à base 4 à partir d'une dilution de terre à  $10^{-5}$  (les tubes positifs à  $10^{-5}$  sont compris dans ce total) ; le nombre de tubesensemencés à chaque dilution étant  $n = 10$ , on a :

$$Nm_4 = \frac{37}{10} = 3,7$$

et :

$$Nm_{10} = 3,7 \times 0,602 + 5 = 7,227$$

0,602 étant log. 4.

On a donc ainsi un ensemble de résultats donnant la valeur des  $Nm_{10}$  pour chaque lecture, faites au bout des temps indiqués ci-dessus.

Si on transcrit ces résultats en portant en ordonnée les valeurs de  $Nm_{10}$  et en abscisse les valeurs des inverses du temps  $t$ , c'est-à-dire  $1/t$ , les points se disposent autour d'une droite.

Le calcul statistique montre que le phénomène peut être, dans ces conditions, considéré comme linéaire, entre le troisième ou le quatrième jour et l'infini. Nous développerons ce point de vue statistique dans une note suivante.

Il suffira d'interpoler ces points graphiquement (ce qui suffit le plus souvent) ou par le calcul, pour avoir la droite représentative de la cinétique de la numération. Cette droite coupe les ordonnées en un point qui n'est autre que la valeur de  $Nm_{10}$  pour un temps  $t$  infini, puisque  $\frac{1}{\infty} = 0$ . Cette valeur que nous désignerons par  $Nm_{10\infty}$  permet donc d'avoir la situation correspondant à un temps d'étude extrêmement long, au moins trois mois (en principe pour un temps infini d'étuve).

Autrement dit, il est possible de déterminer en vingt jours le nombre de germes qu'on aurait réellement trouvé en laissant les tubes de la numération à l'étuve plusieurs mois. Ce résultat nous paraît très avantageux.

D'abord il est indépendant du temps, ce qui est très appréciable, chaque terre à comparer ne réagissant pas forcément à la même vitesse. Un temps de culture arbitraire introduit donc inévitablement une imprécision.

En outre, le fait de faire plusieurs lectures à divers temps  $t$  conduit, pour le calcul de la dilution limite atteinte en un temps infini, à une précision plus grande que si on effectuaient une seule lecture après un temps d'étuve très long. Tout se passe, en effet, comme si on avait fait plusieurs répétitions ; ce qui économise beaucoup de travail. La précision obtenue est bien inférieure à  $\pm 0,3$  sur log.  $N$ . Son calcul en est complexe et sera

examiné dans une prochaine note, où nous donnerons également les justifications statistiques nécessaires pour démontrer le bien-fondé de notre méthode. Dans une troisième note nous exposerons la signification des résultats obtenus.

#### V. — CALCUL DE LOG. N ET DE N.

Le logarithme de N se déduit immédiatement de la valeur de  $Nm_{10} \infty$  à l'aide de la formule :

$$\text{Log. N} = Nm_{10} \infty - K$$

K étant une constante dont la valeur dépend de la raison des dilutions : si  $a = 2$ ,  $K = 0,401$  ; si  $a = 4$ ,  $K = 0,552$ .

Ces valeurs sont tirées des tables de Fisher [6]. Avec des dilutions de raison 4, cette formule est applicable dans les conditions suivantes : à la première lecture il faut avoir la dilution ayant servi d'origine aux dilutions à base  $a$ , et au moins la dilution suivante entièrement positive (ce qui, en pratique, revient à dire que  $Nm_4 > 3$ ) ; à la dernière lecture il faut avoir également au moins deux dilutions entièrement négatives, sinon il faut utiliser les tables de Fisher [6].

Le plus souvent il suffira de commencer par faire des dilutions de raison 10 jusqu'à  $10^{-5}$ , puis 10 dilutions de raison 4 ; avec ce dispositif expérimental, on se trouvera pratiquement toujours dans les limites ci-dessus, quelle que soit la terre. C'est seulement dans le cas où le nombre présumé de germes sera inférieur à  $10^6$  ou supérieur à  $10^9$  qu'il faudra partir de la dilution  $10^{-4}$  dans le premier cas et  $10^{-6}$  dans le second. Dans la table 1 nous donnons les valeurs de  $\eta$  et  $\log. \eta$  permettant d'avoir très simplement la valeur de N et  $\log. N$  directement à partir de  $Nm_{10}$  ou  $Nm_{10} \infty$ . Cette table a été établie pour des dilutions de raison 4 ;  $\eta$  représente le nombre correspondant à la partie décimale de  $Nm_{10}$ . On procède ainsi : chercher dans la colonne marquée  $Nm_{10}$  la partie décimale de ce nombre, on trouve dans les deux colonnes voisines les valeurs de  $\log. \eta$  et de  $\eta$ . Si on désire avoir  $\log. N$  il suffit d'ajouter le nombre trouvé dans la colonne  $\log. \eta$  à la partie entière de  $Nm_{10}$ . Si on désire avoir N il suffit de multiplier la valeur de  $\eta$  par la puissance de 10 correspondant à la partie entière de  $Nm_{10}$  ; exemple : si on a  $Nm_{10} = 7,23$ , on trouve dans la table  $\log. \eta = 1,678$  et  $\eta = 0,477$ .

Dès lors :

$$\text{Log. N} = 7 + 1,678 = 6,678$$

et :

$$N = 0,477 \cdot 10^7.$$



Cette table évite donc l'usage de la table de logarithme et des tables de Fisher, mais toujours aux mêmes conditions limitatives énoncées ci-dessus.

DILUTION DE RAISON 4.											
Nm <sub>10</sub>	log $\eta$	$\eta$	Nm <sub>10</sub>	log $\eta$	$\eta$	Nm <sub>10</sub>	log $\eta$	$\eta$	Nm <sub>10</sub>	log $\eta$	$\eta$
0,00	1,448	0,281	0,25	1,698	0,499	0,50	1,948	0,888	0,75	0,198	1,58
0,01	1,458	0,287	0,26	1,708	0,511	0,51	1,958	0,908	0,76	0,208	1,61
0,02	1,468	0,294	0,27	1,718	0,523	0,52	1,968	0,929	0,77	0,218	1,65
0,03	1,478	0,301	0,28	1,728	0,535	0,53	1,978	0,952	0,78	0,228	1,69
0,04	1,488	0,308	0,29	1,738	0,547	0,54	1,988	0,974	0,79	0,238	1,73
0,05	1,498	0,315	0,30	1,748	0,560	0,55	1,998	0,997	0,80	0,248	1,77
0,06	1,508	0,322	0,31	1,758	0,574	0,56	0,008	1,02	0,81	0,258	1,81
0,07	1,518	0,330	0,32	1,768	0,587	0,57	0,018	1,04	0,82	0,268	1,85
0,08	1,528	0,338	0,33	1,778	0,600	0,58	0,028	1,06	0,83	0,278	1,90
0,09	1,538	0,345	0,34	1,788	0,614	0,59	0,038	1,09	0,84	0,288	1,94
0,10	1,548	0,353	0,35	1,798	0,629	0,60	0,048	1,12	0,85	0,298	1,99
0,11	1,558	0,362	0,36	1,808	0,643	0,61	0,058	1,14	0,86	0,308	2,03
0,12	1,568	0,370	0,37	1,818	0,658	0,62	0,068	1,17	0,87	0,318	2,08
0,13	1,578	0,379	0,38	1,828	0,673	0,63	0,078	1,20	0,88	0,328	2,13
0,14	1,588	0,388	0,39	1,838	0,689	0,64	0,088	1,22	0,89	0,338	2,18
0,15	1,598	0,397	0,40	1,848	0,705	0,65	0,098	1,25	0,90	0,348	2,23
0,16	1,608	0,406	0,41	1,858	0,722	0,66	0,108	1,28	0,91	0,358	2,28
0,17	1,618	0,415	0,42	1,868	0,738	0,67	0,118	1,31	0,92	0,368	2,33
0,18	1,628	0,425	0,43	1,878	0,755	0,68	0,128	1,34	0,93	0,378	2,39
0,19	1,638	0,435	0,44	1,888	0,774	0,69	0,138	1,37	0,94	0,388	2,44
0,20	1,648	0,445	0,45	1,898	0,791	0,70	0,148	1,41	0,95	0,398	2,50
0,21	1,658	0,455	0,46	1,908	0,809	0,71	0,158	1,44	0,96	0,408	2,56
0,22	1,668	0,466	0,47	1,918	0,828	0,72	0,168	1,47	0,97	0,418	2,62
0,23	1,678	0,477	0,48	1,928	0,848	0,73	0,178	1,50	0,98	0,428	2,68
0,24	1,688	0,488	0,49	1,938	0,867	0,74	0,188	1,54	0,99	0,438	2,74

## VI. — EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX.

a) *Quelques résultats comparés.* — Pour une terre de jardin voisine des mulls nous avons trouvé (les trois premières dilutions étant faites en pyrophosphate à 1 p. 1 000) :

Gélose à l'extrait de terre,  $73 \cdot 10^6$  ;

Ancienne méthode [4] en milieu liquide, lecture faite au quinzième jour,  $240 \cdot 10^6$  ;

Numération cinétique,  $404 \cdot 10^6$  ;

Numération en fluorescence [1],  $3,0 \cdot 10^9$ .

b) *Résultats obtenus avec différentes terres.* — Les terres, dont nous donnons les résultats de numération cinétique, ont été conservées à humidité constante en récipient de 2 l, à la température du laboratoire ( $20^\circ$  environ) pendant un temps de un à

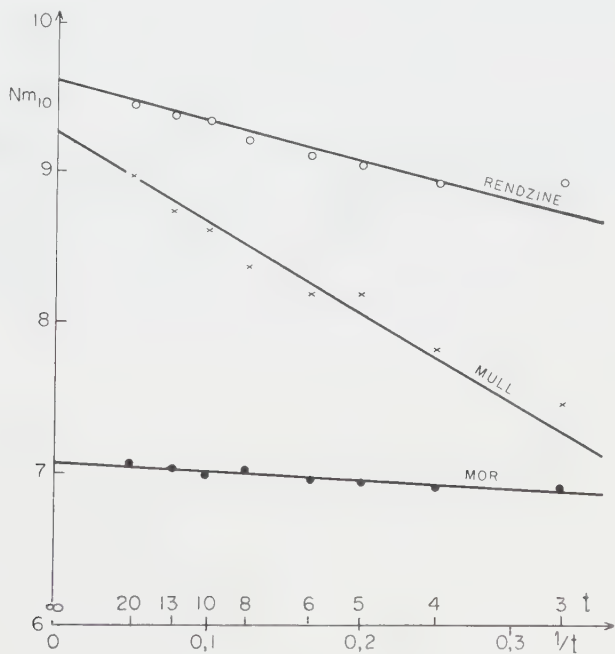


FIG. 1.

trois mois, avant d'effectuer l'expérience. Les raisons de cette attitude seront données dans nos prochaines notes sur le même sujet.

### 1° Groupe des rendzines.

α) Rendzine grise :  $4,14 \cdot 10^7$  ;

β) Rendzine brune de Charente :  $1,06 \cdot 10^9$  ;

γ) Rendzine brune partiellement lessivée se rapprochant des sols bruns :  $7,22 \cdot 10^8$ .

*2° Groupe des mulls et sols bruns.*

- a) Terre de jardin voisine des mulls :  $3,85 \cdot 10^8$  ;
- β) Terre de jardin sableuse de la région de Fontainebleau :  $1,94 \cdot 10^7$  ;
- γ) Terre de grande culture de Seine-et-Oise :  $1,37 \cdot 10^8$ .

*3° Groupe des terres acides.*

- a) Sol brun acide :  $1,12 \cdot 10^8$  ;
- β) Mor :  $3,2 \cdot 10^6$ .

*4° Groupe des terreaux.*

- a) Terreau artificiel :  $8,6 \cdot 10^7$  ;
- β) Terreau naturel (feuille et paille) :  $8,2 \cdot 10^7$ .

Toutes ces terres, dans la situation où nous les avons prises, donnent sur les coordonnées choisies des résultats qui peuvent être considérés comme linéaires. Nous verrons dans les notes suivantes qu'il n'en est pas toujours ainsi et nous préciserons ce à quoi cela correspond. Nous donnons à titre d'exemple à la figure 1 la représentation graphique des résultats correspondant à trois terres, une rendzine, un mull et un mor.

## RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

La méthode que nous proposons pour augmenter la précision des numérations en milieu liquide est basée sur la dynamique des numérations ordinaires (faites également en milieu liquide). Ce principe repose sur le fait de constatations expérimentales, qu'une terre, après repos au laboratoire, donne des résultats de numérations tels que les dilutions limites apparentes atteintes pour différentes valeurs du temps  $t$  s'ordonnent linéairement par rapport aux différentes valeurs de  $1/t$ . Il est donc possible d'en déduire la dilution limite qui serait atteinte pour  $\frac{1}{t} = 0$ , c'est-à-dire  $t = \infty$ . Ce mode de numération est donc indépendant du temps d'étuve, quelle que soit la terre analysée.

## SUMMARY

## BIOLOGICAL COUNTING OF TELLURIC GERMS.

## A NEW METHOD OF EVALUATION : THE CINETIC COUNTING.

The method described increases the precision of counting in liquid media and is based on the dynamics of usual enumerations. It is founded on the following experimental findings : a soil kept

at the laboratory yields counting results showing that the apparent limit dilutions for the different values of time  $t$ , are directly proportional to  $1/t$ . It is then possible to infer the limit dilution which would correspond to  $t = 0$ , i. e.  $t = \infty$ . Consequently this method of counting is independent of the time passed in the incubator, whichever soil analyzed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGIER (J.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 615.
- [2] DOMMERGUES (Y.). *VI<sup>e</sup> Congrès international de la Science du Sol. Volume des suppléments* (sous presse).
- [3] CHALVIGNAC (M.-A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 705.
- [4] CHALVIGNAC (M.-A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 602.
- [5] AUGIER (J.) et LAVERGNE (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 766.
- [6] FISHER (R. A.) et YATES (F.). *Statistical tables for biological and Medical Research*, London, 1953.
- [7] COCHRAN (W. G.). *Biometrics*, 1950, **6**, n° 2, 105.
- [8] AUGIER (J.). [A paraître.]

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 3 Juillet 1958

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## COMMUNICATIONS

### ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ *IN VITRO* D'*ACTINOBACTERIUM ISRAELI* ET D'*ACTINOBACTERIUM MEYERI* A L'OLÉANDOMYCINE

par A.-R. PRÉVOT et Y. de MELLIS.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

INTRODUCTION. — Les recherches faites sur l'actinomycose à l'Institut Pasteur depuis 1946 [4 à 8] ont abouti à deux grandes conclusions :

1° Le syndrome actinomycosique est provoqué par des germes multiples pouvant être groupés en trois catégories :

a) Des bactéries aérobies appartenant au genre *Actinomyces* et principalement à l'espèce *Actinomyces bovis* ; nous avons réservé le terme d'actinomycoses vraies aux infections correspondantes.

b) Des bactéries anaérobies strictes appartenant au genre *Actinobacterium*, plus particulièrement aux espèces très fréquentes, *Actinobacterium israeli* et *Actinobacterium meyeri*, moins souvent aux espèces peu fréquentes, *Actinobacterium abscessum*, *Actinobacterium cellulitis* et *Actinobacterium liquefaciens* ; nous avons proposé pour ce groupe nosologique le nom d'actinobactérioses.

c) Des bactéries aérobies et anaérobies n'appartenant à aucun de ces deux genres, mais capables de réaliser seules ou en associations un syndrome semblable aux actinomycoses. Ces bactéries appartiennent surtout aux genres *Fusiformis*, *Fusocillus*, *Corynebacterium*, *Sphero-*



*phorus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. Nous avons proposé pour cet ensemble nosologique le terme de pseudoactinomycoses.

2° L'évolution, le pronostic, la thérapeutique de chacun de ces groupes sont très différents.

a) Les pseudoactinomycoses sont très sensibles *in vivo* et *in vitro* aux antibiotiques classiques et guérissent en très peu de temps.

b) Les actinomycoses et les actinobactérioses sont très peu sensibles aux antibiotiques classiques et leur pronostic reste très grave, aucune thérapeutique véritablement spécifique et efficace n'ayant pu être découverte à ce jour. Toutefois, il faut noter que Mariat [9] a constaté une action inhibitrice de la 4.4'-diaminodiphényl-sulfone sur certains actinomycètes aérobies pathogènes, ouvrant ainsi une possibilité de chimiothérapie de ces infections redoutables, dont certaines formes comportent encore une mortalité de 100 p. 100 (actinomycoses cérébrales et pulmonaires).

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES. — Les essais que nous avons entrepris ont été dirigés dans le but très précis de détecter une activité bactéricide de groupe vis-à-vis des *Actinobacterium*. Ils ont été conduits dans deux voies différentes.

A. *Action des sulfones*. Il faut 500 µg de DDS par centimètre cube de milieu pour inhiber la croissance d'*A. cellulitis* et d'*A. abscessum*, 2 000 µg pour inhiber celle d'*A. israeli* et 5 000 µg pour inhiber celle d'*A. meyeri*. C'est dire que, pratiquement, la DDS n'est pas utilisable pour la chimiothérapie de ces infections, puisque les concentrations inhibitrices sont déjà toxiques. Ceci contraste avec la grande sensibilité des actinomycètes aérobies à la sulfone-mère, sensibilité que nous avons retrouvée, dans des expériences parallèles, pour *Actinomyces bovis*, inhibé par des concentrations du même ordre que celles observées par Mariat dans ses expériences avec les *Nocardia* et les *Streptomyces* pathogènes.

Une autre sulfone, la « 3460 », synthétisée par M<sup>me</sup> de Lestrangé, essayée dans les mêmes conditions, a donné des résultats aussi peu utilisables. Ce n'est donc pas dans la voie des sulfones que nous avons pour suivi nos recherches.

B. *Actions des antibiotiques*. Nous pratiquons systématiquement l'antibiogramme anaérobie de toutes les souches d'*Actinobacterium* que nous isolons. Au début des recherches, c'est par la méthode rapide au vert janus que nous avons réalisé cette étude, et cela avec les quatre antibiotiques classiques : pénicilline, streptomycine, tyrothricine, chloromycétine. Seules la pénicilline et la chloromycétine ont montré une action très légère et très inconstante. Il en fut de même pour l'auromycine, la terramycine, la novobiocine, la furadoïne, la tétracycline, la framycétine, par la méthode des disques de Chabbert utilisés en boîte de Petri anaérobie : action nulle, ou très légère et inconstante.

Par contre, une indication nous fut fournie par une souche qui fut très sensible à la fois à l'érythromycine et à la carbomycine, une autre très sensible à l'érythromycine, une autre à la spiramycine : une action de groupe semblait se dessiner dans la famille de l'érythromycine. Comme aucun de ces trois membres n'avait d'action générale, nous

nous sommes décidés à rechercher l'action de l'oléandomycine, la dernière venue de cette famille. Nous avons opéré avec 16 souches d'*A. israeli* et 16 souches d'*A. meyeri*.

Sur les 16 souches d'*A. israeli*, 6 se sont montrées très sensibles à l'oléandomycine (cercles d'inhibition de 5 à 6 cm de diamètre), 6 se sont montrées moyennement sensibles (cercles de 2 à 3 cm), 4 légèrement sensibles (cercles de 1 cm).

Sur les 16 souches d'*A. meyeri*, 2 se sont montrées très sensibles, 6 moyennement sensibles, 5 légèrement sensibles et 3 insensibles.

Il y a donc lieu d'essayer l'antibiothérapie des actinobactérioses par l'oléandomycine, en faisant précéder l'essai dans chaque cas d'un antibiogramme comportant les quatre membres de cette famille d'antibiotiques, puisque quelques souches peuvent être insensibles (3 sur 32) et d'autres légèrement sensibles seulement (9 sur 32) à l'oléandomycine et que, dans ces derniers cas, l'érythromycine, la spiramycine ou la carbomycine pourrait agir plus activement.

RÉSUMÉ. — Les *Actinobacterium* ne sont pas sensibles aux sulfones-mères aux doses thérapeutiques comme le sont les actinomycètes aérobies. Par contre, ils sont sensibles aux antibiotiques de la famille de l'érythromycine, et tout particulièrement à l'oléandomycine. Il y a donc lieu d'essayer cet antibiotique dans la thérapeutique de ces infections, jusqu'ici sans traitement spécifique.

## SUMMARY

STUDY OF *in vitro* SENSITIVITY OF *Actinobacterium israeli*  
AND *Actinobacterium meyeri* TO OLEANDOMYCIN.

*Actinobacterium* are not sensitive to therapeutical dosages of sulfones, as are aerobic actinomycetes. On the contrary, they are sensitive to antibiotics of the erythromycin group, particularly to oleandomycin. The treatment by this antibiotoxic should then be tried in these infections, for which there exists no specific therapy.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 2.
- [2] LACRONIQUE (G.), PRÉVOT (A.-R.), BÉAL (G. J.) et GOUDAERT (M.). *Rev. Stomat.*, 1948, **49**, 421.
- [3] LATTÉS, GIRALDY, ROUSSEAU, PRÉVOT et LINHARD. *Rev. Stomat.*, 1949, **50**, 539.
- [4] PRÉVOT (A.-R.), BÉAL (G. J.) et TARDIEUX (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 763.
- [5] PRÉVOT (A.-R.), GORET (R.), JOUBERT (L.), TARDIEUX (P.) et ALADAME (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **8**, 85.
- [6] PRÉVOT (A.-R.) et MAZUREK (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 258.
- [7] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. VI<sup>e</sup> Congrès Intern. Microb.*, Rome, 1953. *Symposium sur les Actinomycètes*, p. 40.
- [8] PRÉVOT (A.-R.). *Fiches Prat. Méd. Montpellier*, 1955.
- [9] MARIAT (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 3095.

## ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL SUR LE LAPIN D'UN *SPHEROPHORUS* *sp* DE L'INTESTIN DU TERMITE

par M. SEBALD et Y. de MELLIS.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies  
et Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge)

Au cours d'une étude de la flore anaérobie Gram-négative asporulée de l'intestin postérieur de termites français, notre attention a été retenue par un *Spherophorus* en raison d'un caractère particulier de celui-ci : son pouvoir sulfito-réducteur, exceptionnel chez les anaérobies endogènes. La description complète de ce germe sera publiée ailleurs et nous ne décrirons ici que son pouvoir pathogène expérimental pour le lapin. Nous rappelons toutefois que ce germe appartient au groupe gazogène, non hémolytique, non sérophile obligé du genre *Spherophorus* et qu'il se distingue des espèces antérieurement connues par son pouvoir sulfito-réducteur. Ce germe, non hémolytique, ne nous a semblé doué d'aucun pouvoir pathogène pour la souris et le cobaye. C'est dans le but d'obtenir sur lapin un antiserum agglutinant spécifique et de rechercher une communauté antigénique éventuelle avec d'autres espèces voisines de *Spherophorus* que nous avons entrepris l'hyperimmunisation de lapins (selon la technique classique : injection par voie intraveineuse, deux fois par semaine, de 0,5 puis 1 cm<sup>3</sup> d'une culture jeune de germes vivants lavés).

Un lapin étant mort après la quatrième injection, soit quinze jours après le début de l'expérimentation, un examen anatomopathologique a été pratiqué, dont nous voudrions rapporter les conclusions, pour lesquelles nous avons obtenu l'aide de J.-C. Levaditi (1).

Les colorations bactériologiques, effectuées sur diverses coupes, ne montrent pas la présence de germes (une hémoculture ne nous avait également pas permis d'isoler de germes).

Les lésions anatomo-pathologiques observées, surtout cardiaques et hépatiques, ne semblent pas en rapport avec un processus septicémique, mais avec un processus toxique ou allergique :

1° Le cœur présente des lésions considérables, surtout myocardiques : les espaces interfasciculaires sont augmentés de volume, des plages de nécrose musculaire rappelant un peu l'aspect des nodules d'Aschoff (mais sans histiocytes) dilatent par endroits ces espaces (fig. 1) : il s'agit donc d'une nécrose musculaire aiguë associée à une myocardite interstitielle aiguë.

Dans d'autres régions de la coupe, le myocarde présente une dégé-

(1) Que nous sommes heureux de remercier ici.

nérescence d'un autre type : nécrose homogène, oxyphile, avec disparition des noyaux et vacuolisation du cytoplasme.

L'endocarde présente des lésions moins considérables : raréfaction et ulcérations, qui semblent secondaires aux lésions du myocarde. Toutefois, il existe en bordure des précipitations fibrineuses secondaires à ces lésions de l'endocarde ; un énorme caillot occupe la lumière du ventricule, et il est par endroits le siège d'un processus de réorganisation conjonctive. Ce caillot réorganisé semble détaché de l'endo-

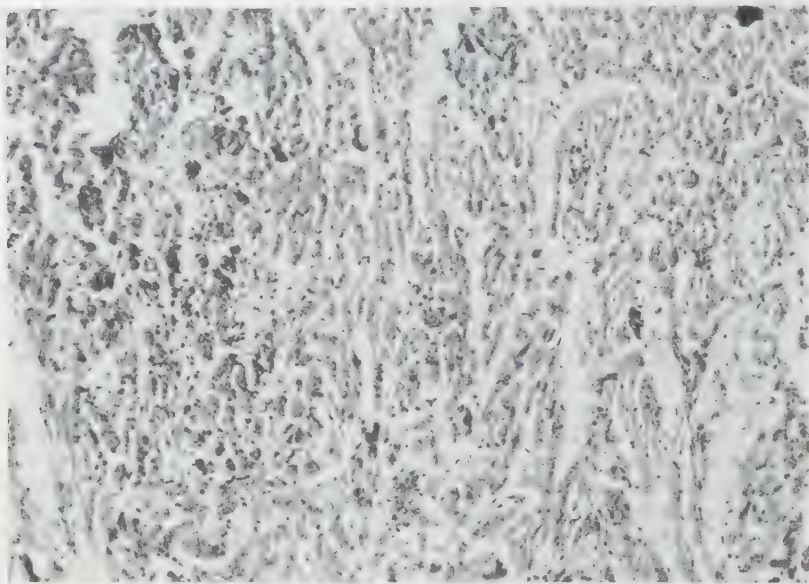


FIG. 1. — Coupe du muscle cardiaque : œdème et infiltration interstitielle avec nécrose oxyphile de nombreuses fibres. Coloration hématoxyline éosine. Oculaire  $\times 6$  ; Objectif  $\times 4$  ; Gr.  $\times 30$ .

carde, mais il est probable qu'il s'agit d'une végétation de celui-ci et qu'il lui est rattaché en un point qui n'intéresse pas la coupe. Une endocardite thrombosante est donc associée à la myocardite aiguë.

Le poumon se présente comme un poumon cardiaque aigu avec une extrême dilatation des veines et des capillaires pulmonaires et une alvéolite hémorragique. Il ne s'agit pas d'un infarctus localisé, l'alvéolite hémorragique semblant étendue à l'ensemble du poumon (fig. 2).

Le foie est le siège d'un processus analogue : les zones hémorragiques intéressent à la fois les régions périportales et péri-sus-hépatiques. A ce niveau, les sinusoides sont dilatés, amincissant les cellules des travées. D'importantes plages de nécrose trabéculaire voisinent avec ces plages hémorragiques.

Au niveau du rein on trouve des infarctus et des lésions de néphrite



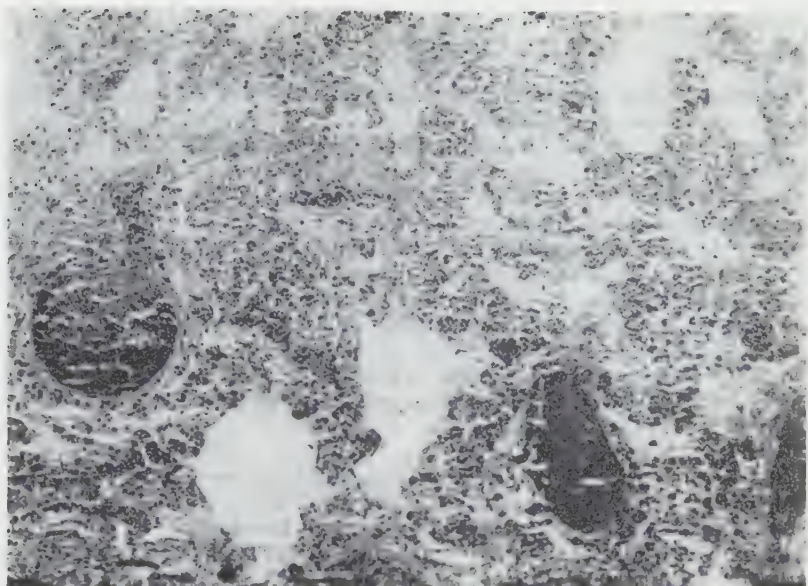


FIG. 2. — Coupe de poumon : vaso-dilatation diffuse et alvéolite hémorragique. Absence de germe et d'infiltration leucocytaire (mêmes caractéristiques que figure 1).

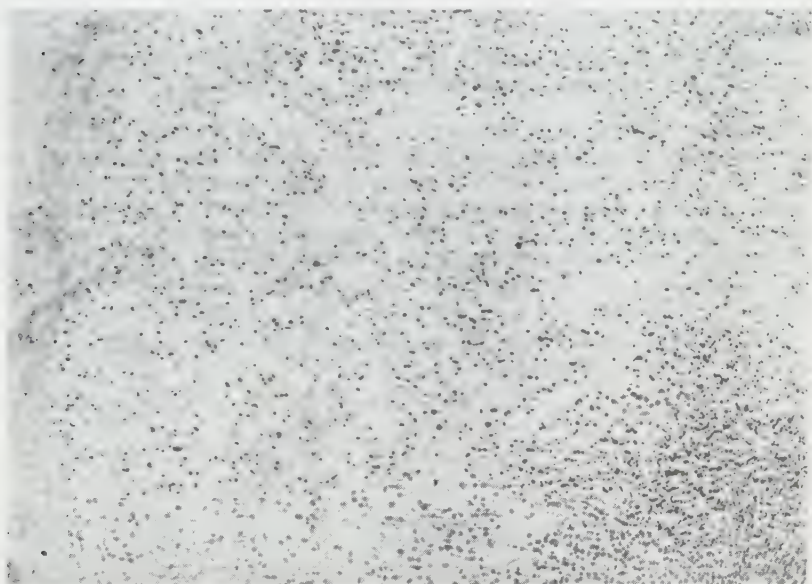


FIG. 3. — Coupe de rate : raréfaction cellulaire de la pulpe rouge et de la pulpe blanche avec fibrose des sinusoides (mêmes caractéristiques que figure 1).



épithéliale, mais le reste du parenchyme rénal étant normal, il semble s'agir de lésions *post mortem*.

Dans la rate on voit une importante raréfaction cellulaire : un tissu fibreux a envahi la pulpe rouge. Cette histiofibrose de la pulpe rouge est parallèle à la pauvreté de la pulpe blanche. Cette réaction fibreuse et cette pauvreté cellulaire semblent dues à un épuisement des possibilités de multiplication du système réticulo-endothélial (fig. 3).

Il s'agit donc d'un processus ni septicémique ni pyogène, mais d'allure toxique ou allergique, les lésions cardiaques étant prédominantes et ayant entraîné rapidement l'atteinte hépatique et pulmonaire (2). Si ces lésions suggèrent un mécanisme antigénique et non toxique, il reste à vérifier cette hypothèse et à rechercher, en particulier, si des lésions de même type peuvent être obtenues après injection de germes tués, par exemple.

Résumé. — Un lapin ayant reçu par voie veineuse quatre injections de germes lavés et vivants d'un *Spherophorus* sulfito-réducteur isolé de l'intestin du termite est mort. A l'examen histologique on constate : nécrose du muscle cardiaque, myocardite interstitielle aiguë et endocardite thrombosante, alvéolite hémorragique du poumon, nécrose hémorragique hépatique, infarctus du rein avec néphrite épithéliale, histiofibrose de la rate. Il s'agit donc dans l'ensemble d'un processus toxique ou allergique et non infectieux.

#### SUMMARY

##### STUDY OF THE PATHOGENICITY FOR RABBITS OF A *Spherophorus* SP ISOLATED FROM THE INTESTINE OF A TERMITE.

A rabbit received four intravenous injections of washed and living sulfite-reducing *Spherophorous* cells, isolated from the intestine of a termite. This rabbit died. The histopathology revealed : myocardium necrosis ; acute interstitial myocarditis and thrombosis by endocarditis ; hemorrhagic lung alveolitis ; hepatic hemorrhagic necrosis ; infarct of the kidney with epithelial nephritis ; histiofibrosis of the spleen. It is therefore a toxic or allergic, not an infectious process.

(2) On peut également évoquer un phénomène de Reilly avec le rôle du système nerveux autonome.

---

**LES PSEUDOMONADACEAE**  
**AGENTS DE SOUILLURE FRÉQUENTS**  
**DES PRODUITS BIOLOGIQUES D'ORIGINE SANGUINE**

par M. BOURGAIN, P.-H. BONNEL et C. RABY.

(Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée,  
Clamart, Seine)

La récolte du sang humain pour son utilisation sous forme de sang conservé, de plasma desséché et d'autres produits dérivés, est assujettie, sur le plan bactériologique, à des contrôles très rigoureux. Occasionnellement, ceux-ci révèlent la présence de souillures, bien que pourtant des précautions d'asepsie très strictes soient prises lors du prélèvement et des diverses manipulations auxquelles ces produits sont soumis.

Les agents de contamination habituels sont des coques, *Bacillus*, corynébactéries, levures et moisissures diverses, mais leur relevé s'est peu à peu enrichi d'une flore qui, sans être nouvelle pour les bactériologistes, présente un intérêt grandissant depuis qu'on a pu constater son extrême diffusion. Il s'agit de bacilles asporulés, Gram-négatifs, d'aspect polymorphe, parfois cocciformes, aérobies de prédilection, mobiles ou non, et de culture en général aisée à la température du laboratoire et même souvent en milieu réfrigéré à +4° C. Ces germes sont soit *achromogènes*, soit *chromogènes* à pigment soluble diffusant dans le milieu de culture ou à pigment insoluble imprégnant les enduits bactériens.

La découverte de cette catégorie de germes a permis pendant longtemps de simplifier, avec le qualificatif de « chromogènes saprophytes », certains diagnostics bactériologiques. Or, s'il n'y a toujours pas de systématique des *Pseudomonadaceae* qui soit unanimement acceptée, depuis peu, les travaux consacrés à cette grande famille se sont multipliés, et des efforts sont entrepris en vue d'en élaborer une taxonomie acceptable.

Brisou, par esprit de classification, propose ainsi de diviser les *Pseudomonadaceae* en trois tribus : *Pseudomonadeae*, Kluyver et Van Niel ; *Achromobactereae*, Magrou et Prévot ; *Chromobactereae*, Magrou et Prévot [1].

Des 156 souches microbiennes isolées de 2 310 contrôles de stérilité effectués, 48 (soit environ 30 p. 100) appartiennent à cette famille des *Pseudomonadaceae*. Dans tous les cas, il s'agit de bacilles très mobiles, ce qui autorise l'élimination du genre *Aplanobacter* de la tribu des *Pseudomonadeae* et du genre *Acinetobacter* de la tribu des *Achromobactereae*.

68 p. 100 des souches sont *chromogènes* à pigment vert ou jaune. Le genre *Serratia* n'a pas été rencontré.

Le diagnostic de *Pseudomonadaceae*, genre *Pseudomonas*, est des plus aisé, à condition de ne pas chercher à établir l'identité individuelle de ses nombreuses espèces. Le plus souvent le pigment est vert, hydrosoluble, parfois fluorescent. Aucune des souches isolées ne possède de pyocyanine.

Les quelques souches à pigment jaune isolées appartiennent à la tribu des *Chromobactereae*, genres *Flavobacterium* et *Xanthomonas*, difficiles d'ailleurs à distinguer l'un de l'autre, n'était le pouvoir phytopathogène des seconds.

Moins nombreuses sont les souches *achromogènes* isolées. Elles appartiennent à la tribu des *Achromobactereae* dans le genre *Achromobacter*. Certaines d'entre elles, à pouvoir alcalinisant, réduisent les nitrates et sont sans action sur les protéines et les glucides. L'étiquette *Achromobacter agile* peut leur être appliquée, selon Brisou [2]. D'autres souches peuvent être identifiées à *Achromobacter alcaligenes* (syn. *Alcaligenes faecalis*), germe sans action sur les nitrates, les protéines et les glucides.

Fait important, *plusieurs souches ont refusé de se développer à la température de 37° C, préférant pour leur croissance des températures comprises entre +4° et +25° C.*

Ces divers *Pseudomonadaceae* que l'on rencontre un peu partout dans l'air, le sol, les eaux, considérés jusqu'à présent comme saprophytes, semi-saprophytes ou agents phytopathogènes, sont actuellement cités sur le plan médical. De tels germes, surtout depuis l'emploi des antibiotiques, sont en effet signalés dans diverses infections où ils interviennent de manière active, soit directement, soit indirectement en association microbienne. C'est ainsi que plusieurs espèces des genres *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, ont été reconnues pathogènes pour l'homme [3].

Il nous a paru opportun de signaler la fréquence des *Pseudomonadaceae* qui peuvent être isolés, soit de produits pathologiques, soit, à l'occasion de contrôles de stérilité, de produits biologiques divers. Leur présence doit être recherchée systématiquement, et leur identification effectuée de façon aussi complète que possible, comme s'il s'agissait de tout autre germe « pathogène ». Cela implique une technique bactériologique adéquate, comportant notamment la mise en culture des produits étudiés à diverses températures et plus particulièrement à celle de 20° C ou inférieure, et une durée d'incubation suffisamment longue pour permettre la multiplication de germes qui ont des exigences particulières et qui peuvent parfois présenter une phase de latence plus ou moins longue sous l'influence d'une température défavorable, d'un antiseptique ou d'un antibiotique.

RÉSUMÉ. — Quarante-huit souches de *Pseudomonadaceae* ont été isolées au cours de 2 310 contrôles de stérilité de produits biologiques d'origine sanguine. Trente-trois d'entre elles étaient chromogènes à pigment vert (*Pseudomonas*) ou jaune (*Flavobacterium* et *Xanthomonas*). Les 15 souches achromogènes appartenaient au genre *Achromobacter*.

De tels germes peuvent être pathogènes pour l'homme et il importe de les rechercher systématiquement en bactériologie humaine et vété-

rinaire dans les produits pathologiques, et en bactériologie de contrôle dans les préparations biologiques injectables. Cette recherche implique diverses précautions et notamment la mise en incubation des cultures à 20° C ou même à une température plus basse, certaines souches de *Pseudomonadaceae* ne se développant pas à la température habituelle d'étuve de 37° C.

## SUMMARY

THE *Pseudomonadaceae* FAMILY,  
FREQUENT SOURCE OF BACTERIAL CONTAMINATION IN STORED BLOOD  
AND BLOOD DERIVATIVES.

Forty-eight strains of *Pseudomonadaceae* were isolated in 2,310 sterility tests made on stored blood and blood derivatives. Thirty-three of them produced green (*Pseudomonas*) or yellow (*Flavobacterium* and *Xanthomonas*) pigments. The 15 non-pigment-forming strains belonged to the genus *Achromobacter*.

Such germs may be pathogenic for man, and it is important to provide for their systematic detection in pathological products in human and veterinary bacteriology and in injectable biological products in control bacteriology. This implies taking various precautions and especially incubation of cultures at 20° C or even at a lower temperature, as certain strains of *Pseudomonadaceae* do not grow at the classical temperature range of 37° C.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 397.
- [2] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 369.
- [3] MOLLARET (L.) et CHAMFEUIL (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 643.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Antigènes des *Brucella*. I. Généralités. Etude des endo-antigènes et des antigènes glucido-lipido-polypeptidiques par les méthodes de diffusion en gel**, par L. CARRÈRE, J. ROUX et A. SERRE.

**Effet thérapeutique de l'association isoniazid-streptovaricine sur la tuberculose expérimentale du cobaye**, par A. LUTZ et M. A. WITZ.

**La numération des germes telluriques par voie biologique. Une nouvelle méthode d'appréciation : la numération cinétique. II. Interprétation**, par J. AUGIER.

## AVIS

Le XIII<sup>e</sup> Symposium annuel sur les recherches sur le cancer aura pour sujet « Genetics and neoplastic growth » et se tiendra les 26, 27 et 28 février 1959 à l'Université du Texas, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, U. S. A.

Pour tous renseignements, s'adresser au Président, Dr Felix L. Haas, Department of Biology, M. D. Anderson Hospital, Houston 25, Texas, U. S. A.

★ ★

L'International Deborah Symposium on Tuberculosis, réuni sous les auspices du Deborah Sanatorium and Hospital, se tiendra les 20, 21 et 22 novembre 1958, au Bellevue-Stratford Hotel, Philadelphia, Pa. Pour tous renseignements, s'adresser au Président : Dr George N. J. Sommer, Bellevue-Stratford Hotel, Broad and Walnut Street, Philadelphia, Pa., U. S. A.

★ ★

Le Comité Scientifique de la Ligue Nationale Française contre le Cancer communique l'information suivante :

Les élèves et anciens élèves de l'Ecole supérieure des Sciences Economiques et Commerciales de l'Institut Catholique de Paris ont décidé d'attribuer en 1959, comme ils l'ont fait les années précédentes, un prix de 100 000 francs au moins à l'auteur, Français ou étranger, âgé de 40 ans au plus, du meilleur travail de recherches sur le cancer, effectué en France ou dans l'Union Française, inédit ou publié au cours des trois dernières années.

Pour tous renseignements, s'adresser au Président, le professeur A. Lacassagne, Ligue Nationale Française contre le Cancer, 6, avenue Marceau, Paris, 8<sup>e</sup>.

---

LIVRES REÇUS

**Houben Weyl.** — *Methoden der organischen Chemie*. 4<sup>e</sup> édition complètement remise à jour, tome I, volume 1 : *Méthodes générales de travail de laboratoire*. 1 048 pages, Georg Thieme, édit., Stuttgart, 1958. Prix : DM. 198.

Les méthodes modernes de travail de laboratoire sont d'une importance capitale pour les chimistes organiciens et pour les biochimistes. La publication des « Allgemein Laboratoriums Praxis », 1<sup>er</sup> volume, a trait à une très grande partie de ces méthodes. Nous y trouvons la description de matériaux de laboratoire et des méthodes de séparation, d'isolement et de purification des produits. A côté des méthodes dont les principes sont déjà fort anciens, mais dont le développement tient compte de l'expérience actuelle, de nouveaux domaines



de travail tels que les combinaisons doubles, les combinaisons d'inclusion, les échangeurs d'ions, les résines Redox et l'électrophorèse préparative y sont étudiés. Toutes ces méthodes sont accompagnées d'un développement théorique qui en permet et en facilite la compréhension.

De nombreux dessins accompagnent la description des appareils.

La présentation de ce tome est aussi impeccable que celle des volumes précédents.

A. F.

**A. H. Cook.** — *The chemistry and biology of yeasts*. 1 vol., 763 p., Academic Press Inc., New York, 1958. Prix : \$ 22,00.

Les recherches sur les levures se sont tellement développées au cours de ces dernières années que l'ensemble de la question peut difficilement être embrassé par un seul auteur. C'est pourquoi le rédacteur, A. H. Cook, a fait appel à plusieurs spécialistes, chacun traitant le chapitre qui lui est le plus familier, ce qui a permis de rassembler en un volume un très grand nombre d'informations.

Les premiers chapitres sont consacrés surtout à la biologie des levures : classification, répartition dans la nature, constitution génétique. Puis sont étudiés les aspects chimiques : constitution chimique, métabolisme et mécanismes enzymatiques qui régissent les diverses modifications de ce métabolisme. Enfin une dernière partie traite de questions plus générales : formes pathogènes des levures, leur importance dans la détérioration des aliments, etc.

C'est vraisemblablement la première fois qu'une vue d'ensemble aussi complète est présentée sur ce vaste sujet, et il faut louer le soin avec lequel chaque chapitre est rédigé, la bibliographie qu'il comporte et la table analytique très détaillée qui termine le volume.

H. T.

**R. E. Tunbridge, M. Keech et J. F. Delafresnay.** — *Connective tissue. A Symposium organized by the Council for International Organizations of Medical Sciences*. 1 vol., 371 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1957.

Le Symposium sur le tissu conjonctif tenu à Londres a été exposé dans cet ouvrage de plus de 350 pages.

Le fait nouveau qui ressort de cet exposé est l'importance prise par l'histochimie, la microscopie électronique et les considérations physiques sur la structure des fibres conjonctives et de la substance interstitielle. A titre d'exemple, le nombre des acides connus présents dans le conjonctif interstitiel est maintenant précisé, le rôle de chacun d'eux, leur structure stéréochimique, leur procédé d'extraction et même leur combinaison *in vitro* avec les polyosides bactériens (A. Delaunay et S. Bazin) y apportent un élément nouveau. De même Bear et Morgan apportent par les techniques de diffraction en lumière blanche et aux rayons X des précisions sur la structure des fibrilles collagènes.

Bien que cet ouvrage ne soit pas directement en rapport avec la bactériologie, il est pour nous un élément indispensable à l'étude des réactions tissulaires devant l'agression microbienne.

J.-C. L.

**H. Raettig.** — *Bakteriophagie*. 2 vol., 559 p., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958.

Véritable travail de bénédictin ces deux volumes de poche, de plus de 500 pages au total, sont un catalogue et un exposé rapide des travaux effectués sur la bactériophagie depuis la découverte d'Hérelle en 1917.

Le format bible et la couverture en plastic font de ce dictionnaire qui comporte 5 655 références *in extenso* un instrument de travail commode pour tous ceux qui s'occupent du problème du bactériophage

J.-C. L.

*La mesure des niveaux de santé. Rapport d'un groupe d'étude. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1957, n° 137, 34 p. Prix : Fr. s. 1,—, 1/9 ou \$ 0,30.

Le présent rapport d'un groupe d'étude assoit la notion de santé sur la définition donnée dans la Constitution de l'O. M. S. et fait le point des connaissances qu'on possède sur la mesure des niveaux de santé.

La diminution des taux de mortalité et l'augmentation des espérances de vie ont servi jusqu'ici d'indicateurs de l'amélioration du niveau de santé. Le groupe d'étude a estimé qu'il fallait trouver une meilleure formule. Il a examiné les données statistiques disponibles et suggéré de nouveaux indicateurs sanitaires éventuels pris dans les domaines de la nutrition, de l'assainissement et de la santé mentale. Il a estimé que c'était une erreur de vouloir mesurer l'état de santé en se fondant uniquement sur le nombre de médecins et de lits d'hôpitaux par rapport à une unité démographique donnée, sans chercher à déterminer dans quelle mesure la population y a effectivement recours.

Le groupe a été d'avis qu'on possédait encore des connaissances et une expérience insuffisantes en la matière et il a recommandé que les institutions médicales et sanitaires entreprennent des études et des recherches concrètes spéciales pour permettre l'élaboration de meilleurs indicateurs sanitaires, en ce qui concerne notamment les aspects positifs de la santé.

En annexe au rapport figure une liste des sources d'information sur les statistiques sanitaires et les enquêtes sur la morbidité auxquelles les participants ont puisé.

L. L.

*L'épilepsie juvénile : Rapport d'un groupe d'étude. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1957, n° 139, 51 p. Prix : Fr. s. 1,—, 1/9 ou \$ 0,30.

Le groupe d'étude qui a préparé en 1955 ce rapport était composé de physiologistes, pédiatres, psychiatres, généticiens et spécialistes de médecine sociale. Les chapitres traités sont les suivants : fréquence, physiopathologie, étiologie, modifications psychiques et autres phénomènes cliniques, organisation des soins et de l'assistance aux enfants épileptiques, dépistage et surveillance des cas, traitement médical et social, questions de santé publique.

L. L.

*Effets génétiques des radiations chez l'homme. Rapport d'un groupe d'étude réuni par l'O. M. S. et communications présentées par plusieurs membres de ce groupe.* Genève, 1957, 184 p. Prix : Fr. s. 8,—.

L'emploi grandissant de l'énergie nucléaire et des rayons X comporte certains risques par les mutations qu'ils peuvent provoquer. Pour ramener ces dangers au minimum il est important de mieux connaître les effets de l'irradiation et de préciser les doses maximum de rayonnement que peuvent tolérer les populations et les individus. Les sources de rayonnement sont nombreuses : le rayonnement cosmique, le radium, thorium et potassium de l'écorcé terrestre, les radio-éléments naturels présents dans les tissus vivants ; les sources artificielles sont constituées par les substances radio-actives et tubes à rayons X, accélérateurs de particules, réacteurs atomiques, radio-éléments disséminés par l'homme dans la nature, postes de télévision, cadrans luminescents, etc. Du point de vue génétique, c'est la dose totale accumulée de rayonnements qui a le plus d'importance. Ces doses sont souvent inutilement élevées. Le groupe suggère un certain nombre de recherches que les spécialistes de la génétique humaine doivent entreprendre en liaison avec les spécialistes de la génétique expérimentale. Les effets possibles des rayonnements sur le patrimoine héréditaire ont une telle importance que les recherches génétiques doivent être amplifiées sans délai. Les divers rapports traitent de nos connaissances actuelles sur les taux de mutation et sur les moyens dont nous disposons pour les apprécier en génétique humaine.

L. L.

*Compte-rendu des communications et discussions de la Réunion bisannuelle de la Kolloid Gesellschaft tenue à Bad-Oeynhausen, les 26 et 27 septembre 1957.* Vol. 18 (1958), D. Steinkopff, édit., Darmsadt. Prix : DM 50.

Réunion consacrée à la chimie colloïdale des substances macromoléculaires naturelles. Vingt-deux communications par des auteurs appartenant à différents pays. Les sujets traités vont des données nouvelles sur l'ultrastructure des fibres naturelles à l'étude de la réaction toxine-antitoxine diphtérique. C'est ainsi que sont traitées les questions concernant la structure des polyosides, l'eau de gonflement des grains d'amidon, la gélification et le gonflement, les mesures de viscosité et de diffusion de la lumière des solutions macromoléculaires, etc.

J.-C. L.

**Pierre Morel.** — *La cytologie de la moelle osseuse.* 1<sup>er</sup> volume. 1 vol., 137 p., 101 fig., Editions du Lama, Lyon, 1958.

L'auteur a voulu se borner à présenter ici une étude de la ponction sternale et des frottis médullaires en général. Il passe d'abord en revue les diverses théories de l'hématopoïèse et les éléments figurés de la moelle osseuse, puis les hémopathies malignes ou sévères de la série blanche. Une illustration très abondante éclaire le texte et constitue à elle seule un guide précieux pour l'hématologiste, mais l'ouvrage n'aurait pu que gagner à observer avec plus de soin les règles de l'orthographe et de la syntaxe.

H. T.



# JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Editors : B. C. J. G. KNIGHT and A. F. B. STANDFAST.

Contents of Vol. 19, No. 1, August 1958.

- CAIN, R. B. The microbial metabolism of nitro-aromatic compounds.
- GRIGG, G. W. The genetic control of conidiation in a heterokaryon of *Neurospora crassa*.
- ADA, G. L., PERRY, B. T. and ABBOT, A. Biological and physical properties of the Ryan strain of filamentous influenza virus.
- ADA, G. L. and PERRY, B. T. Properties of the nucleic acid of the Ryan strain of filamentous influenza virus.
- HARRIS, K. A study of *Mallomonas insignis* and *Mallomonas akrokomos*.
- MASON, D. J. and POWELSON, D. Lysis of *Myxococcus xanthus*.
- BHASKARAN, K. Genetic recombination in *Vibrio cholerae*.
- GOULDEN, J. D. S. and SHARPE, M. E. The infra-red absorption spectra of lactobacilli.
- LEWIN, R. A. The cell walls of *Platymonas*.
- HARRIS-SMITH, P. W., SMITH, H. and KEPPIE, J. Production *in vitro* of the toxin of *Bacillus anthracis* previously recognised *in vivo*.
- BINGH, B. N., MATHEW, S. and NAND, N. The role of *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* and certain amino acids in the excystment of *Schizopyrenus russelli*.
- GIBSON, T., STIRLING, A. C., KEDDIE, R. M. and ROSENBERGER, R. F. Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures.
- BAILEY, R. W. and OXFORD, A. E. A quantitative study of the production of dextran from sucrose by rumen strains of *Streptococcus bovis*.
- LONES, D. P., RAINBOW, C. and WOODWARD, J. D. A diazotizable amine produced by yeast: its chemical nature and factors affecting its accumulation.
- FORD, J. E. B<sub>12</sub>-vitamins and growth of the flagellate *Ochromonas malhamensis*.
- KERR, N. S. and SUSSMAN, M. Clonal development of the true slime mould, *Didymium nigripes*.
- PEREIRA, H. G. and VALENTINE, R. C. Infectivity titrations and particle counts of adenovirus type 5.
- ASCHNER, M. and KOHN, S. The biology of *Harposporium anguillulae*.
- GUNDERSEN, K. Influence of corn steep liquor on the oxidation of ammonia to nitrite by *Nitrosomonas europaea*.
- WILLIAMSON, D. H. and WILKINSON, J. F. The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species.
- MACRAE, R. M. and WILKINSON, J. F. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*.

The subscription rate is 90s. net per volume of 3 parts.

Single parts 35s. each, plus postage. Two volumes will be issued each year. Orders should be sent to your bookseller or to

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

BENTLEY HOUSE 200 EUSTON ROAD. LONDON N.W. 1.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1958. — 3<sup>e</sup> trimestre. — Numéro d'ordre 2882. — Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris.  
Anc<sup>ie</sup> Imp. de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.